

**Bestimmung von Progesteron
im peripheren Rinderblut während
verschiedener Phasen der Trächtigkeit**

Erich Josef März

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München
Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Bestimmung von Progesteron im peripheren Rinderblut
während verschiedener Phasen der Trächtigkeit

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Erich Josef März
aus Türkheim

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. DDr.DDr.h.c. J. Brüggemann

Korreferent: Prof. Dr. M. Rüsse



Tag der Promotion: 5. Februar 1971

M E I N E N E L T E R N

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. Vorbemerkung	1
2. Literaturteil	2
2.1. Chemische Struktur, Biosynthese, Stoffwechsel und Ausscheidung von Progesteron	2
2.2. Biologische Wirkung von Progesteron und Regulation der Progesteronbiosynthese	5
2.2.1. während des Zyklus	5
2.2.2. während der Trächtigkeit	7
2.3. Progesteronproduzierende Organe während des Zyklus und der Trächtigkeit	10
2.3.1. Corpus luteum	10
2.3.2. Nebennierenrinde	11
2.3.3. Plazenta	12
2.4. Progesteron während der Trächtigkeit bei landwirtschaftlichen Nutztieren	13
2.4.1. Rind	13
2.4.2. Schaf	19
2.4.3. Ziege	20
2.4.4. Pferd	21
2.4.5. Schwein	22
3. Methodischer Teil	24
3.1. Tiermaterial und Probennahme	24
3.2. Möglichkeiten zur quantitativen Messung von Progesteron in niedrigen Konzentrationenbereichen	25
3.2.1. UV-Messung	25
3.2.2. Doppel-Isotopen-Derivat-Methode	26

	Seite
3.2.3. Gaschromatographie	26
3.2.4. Kompetitive Protein-Bindungs- reaktion	27
3.3. Beschreibung des Verfahrens zur Bestim- mung von Progesteron mittels einer kom- petitiven Protein-Bindungsreaktion	27
3.3.1. Prinzip der Methode	27
3.3.2. Material und Reagentien	31
3.3.3. Extraktion	33
3.3.4. Reinigung und Trennung	34
3.3.5. Eigentliche Protein-Bindungs- reaktion	35
3.3.6. Messungen	36
3.3.6.1. Bestimmung der Radio- aktivität	36
3.3.6.2. Berechnung der Wieder- findung	37
3.3.6.3. Berechnung der in der Probe tatsächlich vor- handenen Progesteron- menge	37
3.3.7. Beurteilungskriterien	39
4. Ergebnisse	41
5. Diskussion	61
6. Zusammenfassung	66
Summary	67
7. Literaturverzeichnis	68
Lebenslauf	

1. VORBEREITUNG

Unter Progesteron verstehen wir ein Hormon, das vornehmlich vom Corpus luteum gebildet wird und das als Sexualhormon eine besondere Bedeutung bei der Regulation des Fortpflanzungsgeschehens hat. Insbesondere ist es für die Vorbereitung und die Aufrechterhaltung der Gravidität essentiell, weshalb es auch als Schwangerschaftsschutzhormon bezeichnet, die Gruppe verwandter Verbindungen als Progestine oder Gestagene benannt wurde.

Unter den Fertilitätsstörungen beim Rind unbekannter Genese spielen aber z.B. die unter dem Begriff "embryonaler Fruchttod" zusammengefaßten Phänomene eine besondere Rolle. Um Einblicke in die für die Fertilität wichtigen Vorgänge zu gewinnen, ist unter anderem die Kenntnis der Progesteronsekretion erforderlich. Erst durch neuere Entwicklungen auf hormonanalytischem Gebiet ist es jedoch möglich geworden, Progesteron in Blutproben aus dem peripheren Blut zu bestimmen.

Im Rahmen einer Teamarbeit des Institutes zur Analyse der endokrinen Faktoren, die an der Regulation des Zyklus und der Gravidität des Rindes maßgeblich beteiligt sind, wurde mir die Aufgabe gestellt, mit einer entsprechend modernen Methode, der kompetitiven Protein-Bindungsreaktion, die Progesteronblutspiegel während der Gravidität analytisch zu erfassen.

2. L I T E R A T U R T E I L

2.1. Chemische Struktur, Biosynthese, Stoffwechsel und Ausscheidung von Progesteron

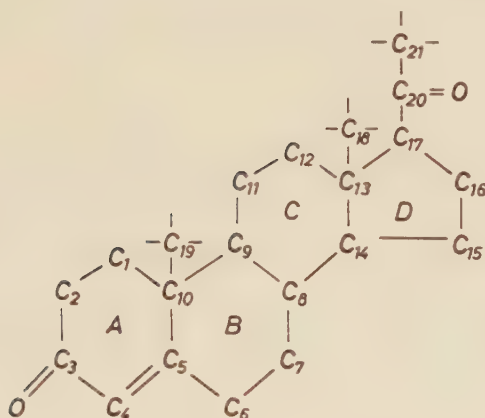
Progesteron gehört zur großen Gruppe der hormonalen Steroide, denen als chemische Grundstruktur einheitlich ein Cyclopentanoperhydrophenantren-Ring, das Steran, zugrunde liegt. Die Steroidhormone selbst können, je nach Anzahl der Kohlenstoffatome am Molekül, in drei Gruppen eingeteilt werden:

1. Solche mit 18 Kohlenstoffatomen, die Östrogene, die außerdem durch den phenolischen A-Ring charakterisiert sind,
2. solche mit 19 Kohlenstoffatomen, zu denen die Androgene und
3. Steroidhormone mit 21 Kohlenstoffatomen, zu denen die Cortikoide und Gestagene gehören.

Progesteron gehört zu den letztgenannten Verbindungen und ist der biologisch wichtigste Vertreter der Gruppe der Gestagene. BUTENANDT und Mitarbeitern gelang es erstmals 1934, das Corpus luteum-Hormon zu isolieren, das erst später Progesteron genannt wurde. Die Summenformel von Progesteron lautet $C_{21}H_{30}O_2$. Die Struktur von Progesteron ist in Abb. 1 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist das Molekül durch jeweils eine Ketogruppe am Kohlenstoffatom Nr. 3 und Nr. 20 sowie durch eine Doppelbindung im A-Ring, der damit ungesättigt ist, zwischen Kohlenstoffatom Nr. 4 und Nr. 5 ausgezeichnet. Demnach ist Pregn-4-en-3,20-dion die exakte chemische Bezeichnung für Progesteron (KARLSON 1964).

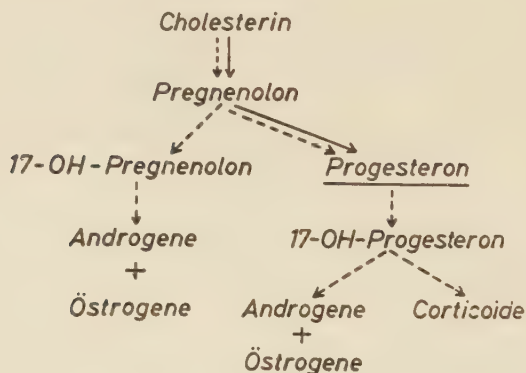
Struktur des Progesterons

(Numerierung der Kohlenstoffatome
und Bezeichnung der Ringe)



Die Biosynthese des Progesterons geht über das Cholesterin. Im nächsten Schritt wird durch oxydative Verkürzung der Cholesterinseitenkette mittels Hydroxylierung am Kohlenstoff 20 und 22, wobei die Restkette als Isokaprönsäure abgespalten wird (KARLSON 1964), Pregn-5-en-3,20-dion gebildet. Dieses wird anschließend zur wichtigen biologischen Schlüsselsubstanz Progesteron dehydriert (SHIMIZU und Mitarb. 1960, MILLER und TURNER 1963). Neben seiner zentralen Stellung im Fortpflanzungsgeschehen des weiblichen Individuums ist Progesteron zugleich eine wichtige Vorstufe in der Biosynthese der anderen Sexualhormone und der Corticoide (WELIKY und ENGEL 1962, EIK-NES und HALL 1962). Die Biosynthese sowie die zentrale Stellung und Schlüsselfunktion des Progesterons ist in Abb.2 zusammengefaßt:

*Biosynthese des Progesterons im
Corpus luteum (ausgezogene Pfeile)
und seine Stellung im Syntheseweg
anderer Steroidhormone (unterbrochene
Pfeile)*



Die Inaktivierung und Ausscheidung des Progesterons findet hauptsächlich über Leber und Niere statt. Die biologischen Inaktivierungen werden im wesentlichen durch Reduktionen der C-3 und C-20 Ketogruppen bzw. Hydrierung des A-Ringes erreicht (HAYANO und Mitarb. 1956). Diese Abbauprodukte werden über den Harn ausgeschieden. Im Harn der Frau wurde als Hauptausscheidungsprodukt von Progesteron Pregnan-3 α ,20 α -diol identifiziert. Nach MARKER und ROHRMANN (1938) kommt das Pregnandiol bei der schwangeren Frau in mehreren epimeren Formen im Harn vor. So stehen die Formen 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol, 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol und 5 α -Pregnan-3 β ,20 α -diol in einem Verhältnis von 100 : 50 : 12 zueinander. Weiterhin wurden im Urin gesunder schwangerer Frauen Pregnan-3,20-dion und 3 α -Hydroxypregnan-20-on gefunden (DAVIS und PLOTZ 1957). Nach KLOPPER (1956) wird Pregnandiol, das in den Faeces auch in freier Form gefunden wurde,

über den Harn hauptsächlich als Pregnan-20 α -diol-glucuronid (als Glucuronsäureester) ausgeschieden.

5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol wurde von HARASZTI und Mitarb. (1968) aus dem Rinderharn als Hauptabbauprodukt des Progesteron-stoffwechsels isoliert. Die Ausscheidung war zyklusbezogen und lag bei 2,0 ng/24 Std. während des Östrus und bei maximal 6,8 ng am 7./8. Zyklustag.

2.2. Biologische Wirkung von Progesteron und Regulation der Progesteronbiosynthese

2.2.1. während des Zyklus

Die Gestagene haben im Wechselspiel mit den Östrogenen an allen wichtigen Stellen des Genitaltraktes für die Fortpflanzung entscheidende Funktionen inne. Insbesondere werden Cervix, Uterus und Eileiter beeinflusst, z.B. durch deren Einfluß auf die Sekretion bzw. die Motilität. Diese Hormonwirkung zeigt sich außerdem in der Umstellung der Uterusschleimhaut von der Proliferationsphase, in der es hauptsächlich unter Einwirkung der Östrogene zu einem Wachstum der Uterindrüsen kommt, in die Sekretionsphase, in der die Differenzierungsvorgänge im Endometrium überwiegen. Diese Umstellung geschieht beim Rind ca. am 5. Tag des Zyklus unter Einwirkung der Gestagene. Hierbei kommt es zunächst zu einer verstärkten Sekretion der Uterindrüsen und weiterhin zur Herabsetzung des Tonus der Uterusmuskulatur. Des weiteren werden durch Rückkopplungsvorgänge auf das hypothalamisch-hypophysäre System weitere Eireifungen unterbunden (KOLB 1967).

Hat eine Konzeption nicht stattgefunden, so kommt es in der Regel nach Abfall des Progesteronblutspiegels zwischen dem 18. und 21. Zyklustag (POPE et al. 1969, STABENFELDT et al. 1969, HOFFMANN 1969), durch Auslösung des negativen Feed-back-Mechanismus zu einer erneuten Ausschüttung von

Hypophysenvorderlappenhormonen (LH) und zur Ovulation und das zyklische Geschehen kann von neuem beginnen (HANSEL und SNOOK 1970, KARG und Mitarb. 1970).

Progesteron entfaltet also seine biologische Wirkung einmal direkt an den Erfolgsorganen und zweitens mittels Rückkopplung auf die hypothalamisch-hypophysären Regelzentren. Diesen hypothalamischen Zentren kommt die zentrale Rolle der Steuerung zu. Hier werden Feed-back-Meldungen als positiv (anregend), negativ (hemmend) oder genügend (wenn ein kritischer Schwellenwert erreicht ist) registriert (KARG 1968, JÖCHLE 1969).

Als verantwortlich für die luteotrope Wirkung, die in der Luteinisierung der Thekazellen nach Berstung des Follikels und der beginnenden Progesteronproduktion besteht, werden im wesentlichen zwei Hormone diskutiert, das Prolaktin und das Luteinisierungshormon (LH). Während bei Maus und Ratte Prolaktin eindeutig luteotrope Wirkung aufweist (ASTWOOD 1941, CUTULY 1942), ließ sich dies beim Rind bis jetzt nicht zeigen (SMITH et al. 1957, ARMSTRONG und HANSEL 1959). Hingegen scheint beim Rind dem LH die luteotrope Wirkung zuzukommen.

So konnten DONALDSON und HANSEL (1965) bei 5 Kühen die Lebensspanne des Corpus luteum nach LH-Applikation um 16 ± 2 Tage verlängern. Eine Verlängerung der Funktionsperiode des Corpus luteum im Zyklus erreichten auch SCHOMBERG et al. (1967) durch intravenöse Verabreichung von 30 mg LH am 15. Zyklustag. Eine neue Brunst stellte sich erst am 27. Tag ein. Ebenso konnten HANSEL und SNOOK (1970) nach einer einmaligen subkutanen Injektion von je 5 mg LH an 4 Kühen Progesteronanstieg im peripheren Plasma von 5-6 ng/ml Plasma auf ca. 9,5-11 ng/ml Plasma innerhalb von 4 Stunden feststellen. Einen direkten Anhaltspunkt für die luteotrope Wirkung endogenen LH's fanden KARG und Mitarb. (1970) während eines abnormen, auf 28 Tage verlängerten Zyklus einer Kuh. Sie konnten feststellen, daß nach Auftreten eines endogenen LH-Peaks am 17. Tage des Zyklus ein weiteres Absinken des

Progesteronblutspiegels zunächst verhindert wurde. Die Progesteronkonzentration stieg dann sogar wieder an und ein endgültiger Abfall des Progesteronspiegels wurde erst am 26. Tag beobachtet.

Durch Inaktivierung des endogenen LH's mit einem Anti-LH-Serum konnten SNOOK und Mitarb. (1969) zeigen, daß sich die Größe der Corpora lutea verminderte und die Progesteronkonzentration im Lutealgewebe abnahm. Eine ähnliche Beobachtung machten KARG und Mitarb. (1970), die nach Verabreichung eines Anti-LH-Serums ein Absinken des Progesteronspiegels im peripheren Blut messen konnten. Scheinbar abhängig von der verabreichten Dosis des Anti-LH-Serums wurde bei einer Kuh, der 3 x 5 ml des Anti-LH-Serums am 12. bzw. 13. Zyklustag intravenös injiziert wurden, ein Abfall von 8,5 auf 5,7 ng/ml Plasma innerhalb von 7 Stunden beobachtet, während bei einer Kalbin, der 30 ml des gleichen Anti-LH-Serums am 12. Zyklustag verabreicht wurden, der Progesteronblutspiegel innerhalb von 5 Stunden von 8,7 auf 1,8 ng/ml Plasma sank.

Für den drastischen Abfall des Progesteronspiegels am Zyklusende wird ein aktives luteolytisches Prinzip verantwortlich gemacht. In Versuchen mit Hysterektomien und Teilhysterektomien konnte gezeigt werden, daß ein solcher Faktor dem Uterus zuzuschreiben sein dürfte, da dadurch die Lebensspanne des Corpus luteum verlängert werden konnte, wie Experimente an Schwein (ANDERSON und MELAMPY 1966), Schaf (CALDWELL 1970) und Rind (HANSEL 1966) zeigten. Über die Regulation dieses luteolytischen Faktors, der noch nicht eindeutig identifiziert ist, ist jedoch noch wenig bekannt.

2.2.2. während der Trächtigkeit

Um nach Befruchtung der Eizelle im Eileiter eine Nidation zu ermöglichen, müssen im Uterus die morphologischen Voraussetzungen dafür geschaffen sein. Diese Wirkung zeigt sich äußerlich, wie bereits in Kap. 2.2.1. beschrieben,

durch Umstellung in die sog. Sekretionsphase.

Um eine Aufrechterhaltung der eingetretenen Gravidität zu gewährleisten, ist hier eine kontinuierliche Progesteronproduktion notwendig, wobei speziebedingt verschiedene endokrine Organe als Progesteronproduzenten in Frage kommen (siehe Kap. 2.4.). Ein entscheidender Punkt in der Regulation der Progesteronbiosynthese muß gleich zu Beginn der Gravidität in der Umstellung des Corpus luteum periodicum in das Corpus luteum graviditatis gesehen werden. Dazu muß der oben (Kap. 2.2.1.) bereits erwähnte luteolytische Faktor ausgeschaltet werden. Wie dies im einzelnen geschieht, ist noch nicht bekannt.

Die Faktoren, welche die weitere Progesteronproduktion während der Gravidität aufrechterhalten, wurden von verschiedenen Autoren untersucht. KALTENBACH et al. (1968) zeigten an Schafen, daß nach Hypophysektomien bei Muttertieren am 21. und 23. Trächtigkeitstag die Früchte innerhalb von 7 Tagen abgestorben waren. NALBANDOV (1970) schloß daraus, daß ein niedriger LH-Spiegel, wie er während der Gravidität des Schafes gefunden wird, zur Aufrechterhaltung der Progesteronproduktion ausreicht bzw. notwendig ist. Ähnliche Versuche wurden bereits von DENAMUR und MAULEON (1963) und DU MESNIL DU BUISSON und LEGLISE (1963) an Schwein und Schaf durchgeführt, die nach Hypophysektomie die Gravidität durch LH-Infusionen aufrechterhalten konnten.

Bei der Spezies Rind ist es schwieriger, einen genauen Zusammenhang zwischen Hypophyse und Ovar zu finden, da bisher noch keine vollständigen Hypophysektomien gelungen sind. Lediglich HENRICKS et al. (1969) konnten die Hypophysenfunktion eines 51 Tage-trächtigen Rindes mittels Hypophysenstiieldurchtrennung anscheinend ganz ausschalten, was aber in einem Beobachtungszeitraum von weiteren 43 Tagen keine Unterbrechung der Gravidität bewirkte.

In "in vitro"-Versuchen (Perfusionsstudien) mit 44 isolierten Rinderovarien aus der Früh- bzw. Hochträchtigkeit versuchten MILLS und MORRISSETTE (1970) die direkte Beziehung

zwischen LH und Progesteron während der Gravidität nachzuweisen. Dabei konnten sie in 33 Fällen einen Anstieg der Progesteronproduktion nach Zugabe von Rinder-LH zum "Zitratblut" messen. Und zwar stieg die Progesteronsynthese von $4,37 \pm 1,12 \mu\text{g}/\text{min}$ auf $7,43 \pm 1,98 \mu\text{g}/\text{min}$ bei Perfusion von Ovarien aus der Frühträchtigkeit und von $4,57 \pm 0,99 \mu\text{g}/\text{min}$ auf $7,72 \pm 1,33 \mu\text{g}/\text{min}$ bei Perfusion von Ovarien aus der Hochträchtigkeit.

Messungen des endogenen LH-Spiegels wurden von SCHAMS (1969) während der Anfangsträchtigkeit zweier Rinder vorgenommen. Zwar wurden signifikante LH-Peaks am 52. bzw. 61. Trächtigkeitstag gefunden, doch fand man vorläufig keine Erklärung. In diesem Zusammenhang ist eher an eine zusätzliche Interferenz von Östrogenen zu denken (KARG und Mitarb. 1970), wie ja auch Brunsterscheinungen bei graviden Tieren gelegentlich bekannt geworden sind. Um eindeutige Kenntnisse über die "in vivo"-Situation der Progesteronsynthese während der Trächtigkeit beim Rind zu erhalten, erscheinen daher weitere Versuche notwendig.

Bei einigen Spezies werden von der Plazenta zusätzliche gonadotrop wirkende Hormone produziert, denen ein Einfluß auf die Progesteronbiosynthese zugeschrieben werden kann. Es ist dies bei der Frau das HCG (Human-Chorionic-Gonadotropin), das bereits 11 Tage nach der Konzeption festgestellt werden kann (MARSHALL et al. 1968) und bei der Stute das PMSG (Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin), dessen Vorkommen zwischen dem 42. und 150. Trächtigkeitstag (NISHIKAWA und HAFEZ 1968) nachgewiesen ist.

Beim Rind konnten bis jetzt noch keine gonadotropen Hormone in der Plazenta nachgewiesen werden (BERTRAND und DESCHANEL 1964), doch zeigten die beiden oben beschriebenen placentären Hormone bei dieser Spezies eine luteotrope Wirkung. So konnten WILTBank und Mitarb. (1961)

mit hCG die Präsenz des Rinder-Corpus-luteums verlängern und HANSEL und SNOOK (1970) mit subkutaner Injektion von 3 000 I.E.PMSG den Plasmaprogesteronspiegel in der Ovar-vene eines Rindes von 9,5 auf ca. 12 ng/ml Plasma erhöhen.

2.3. Progesteronproduzierende Organe während des Zyklus und der Trächtigkeit

2.3.1. Corpus luteum

Unter den progesteronproduzierenden Organen nimmt das Corpus luteum eine Vorrangstellung ein. Dies gilt vor allem im Zyklus. Bei der Beurteilung der Corpus-luteum-Funktion während der Trächtigkeit sind Speziesunterschiede zu berücksichtigen (TURNER 1966). So ist das Corpus luteum graviditatis die wesentliche Progesteronquelle während der Trächtigkeit bei Ratte (JOHNSON und CHALLANS 1930), Kaninchen (FRAENKEL und COHN 1902), desgleichen bei Ziege (MEITES und Mitarb. 1951, HEAP und LINZELL 1965) und Schwein (DU MESNIL DU BUISSON und DAUZIER 1957, SPIES und Mitarb. 1960, SHORT 1960). Hier führen Enukleation bzw. Ovarexstirpation zu jedem Zeitpunkt der Gravidität zu einem Abort (siehe auch Kap. 2.4.).

Beim Schaf führt die Entfernung der Corpora lutea vor dem 55. Trächtigkeitstag zum Abort (NEHER und ZARKOW 1954, DENAMUR und MARTINET 1955, LINDNER und Mitarb. 1964, DEANE und Mitarb. 1966). Auch wenn die Corpora lutea beim Schaf nach dem 60. Trächtigkeitstag noch als Progesteronproduzenten funktionieren (EDGAR und RONALDSON 1958, LINDNER und Mitarb. 1964), so wird ihnen doch keine fruchterhaltende Wirkung mehr zugesprochen (LINZELL und HEAP 1968).

Ähnliche Beobachtungen wurden beim Menschen gemacht, wo das Corpus luteum bis zum ca. 40. Graviditätstag die Hauptprogesteronquelle darstellt. Ovariectomien nach dem 40. Tag der Schwangerschaft bewirken keine Unterbrechung der Gravidität (VENNING 1957, ASDELL 1964).

Auch beim Rind ist das Corpus luteum graviditatis die hauptsächliche Progesteronquelle, obwohl die Entfernung des Corpus luteum zu verschiedenen Zeitpunkten der Gravidität teilweise unklare Ergebnisse brachte (CATCHPOLE 1969). Einheitlich waren Aborte die Folgen der Enukleation oder Ovariectomie im Trächtigkeitszeitraum Tag 1-200. Enukleationen nach dem 200. Trächtigkeitstag resultierten meist in Frühgeburt, Schweregeburt und Retentiones (siehe Kap.2.4.1.).

Aufgrund verschiedenartiger Progesteronproduktionssysteme nimmt das Pferd eine gewisse Sonderstellung ein. Das eigentliche Corpus luteum graviditatis der Stute degeneriert etwa am 35. Tag der Trächtigkeit. In dieser Zeit bilden sich schubartig Follikel an den Ovarien, die zu Corpora lutea auxiliaria umgewandelt werden (AMOROSO 1948). Diese zusätzlichen Gelbkörper stellen eine reichliche Progesteronquelle dar und degenerieren erst nach Tag 150 der Gravidität (COLE und SAUNDERS 1935, COLE und GOSS 1943, CLEGG und Mitarb. 1954, JÖCHLE 1957).

2.3.2. Nebennierenrinde

Progesteron wurde aus der Nebenniere von Rind (BALFOUR und Mitarb. 1957, GORSKI und Mitarb. 1958, SHORT 1960, STORMSHAK und ERB 1961), Schaf (BALFOUR und Mitarb. 1957, SHORT und MOORE 1959) und Schwein (BALFOUR und Mitarb. 1957) isoliert. Genauere Angaben über die Quantität der Progesteronproduktion der Nebennieren sind nicht bekannt. Das Progesteron dürfte hier aber lediglich ein Zwischenprodukt in der Synthese der Glucocorticoide und anderer Nebennierenrindenhormone sein.

2.3.3. Plazenta

Die Plazenta ist das einzige endokrine Organ, das nur während der Gravidität existiert. Während dieser Zeit kann die Plazenta bei einigen Spezies Progesteron produzieren. So wurde Progesteron aus Plazentagewebe von Mensch (DICZFALUSY 1952, PEARLMAN und CERCEO 1952), Schaf (SHORT und MOORE 1959) und Pferd (SHORT 1957) isoliert.

Die Plazenta der Primaten ist ab dem 40. Graviditätstag in der Lage, allein und unabhängig vom Corpus luteum durch das von ihr produzierte Progesteron die Gravidität aufrechtzuerhalten (VENNING 1957, HUTCHINSON und Mitarb. 1962, ASDELL 1964). Nach ZANDER und VON MÜNSTERMANN (1956) besteht eine Relation zwischen den Werten des von der Plazenta produzierten Progesterons und der Größe der Plazenta bei der Frau. Die Menge von nahezu 250 mg Progesteron pro 24 Stunden, die die Plazenta gegen Ende der Schwangerschaft in die mütterliche Blutbahn entläßt, zeigt die Plazenta als reichliche und unabdingbare Progesteronquelle bei der Frau (ZANDER und VON MÜNSTERMANN 1956, PEARLMAN 1957).

Beim Pferd degenerieren ab dem 150. Trächtigkeitstag die Corpora lutea auxiliaria (siehe oben) und die fötale Plazenta übernimmt die Progesteronproduktion (SHORT 1960). SHORT (1957) bestimmte am 120. Tag $7,3 \mu\text{g}$ Progesteron und am 270. Tag $25 \mu\text{g}$ Progesteron je 100 g Plazentagewebe. Auch konnte er Δ^4 -Pregnen-20 β -ol-3on in Plazentagewebe der Stute feststellen. Obwohl in der Plazenta bis zur Geburt Progesteron nachweisbar ist, wurde dieses bisher nicht im peripheren Blut nachgewiesen (SHORT 1957). Er nimmt an, daß die Trächtigkeit nach dem 4. Monat durch einen reinen lokalen Effekt des plazentären Progesterons aufrechterhalten wird, das direkt auf den Uterus wirkt, ohne in die mütterliche Zirkulation zu gelangen. Dafür ist der epitheliochoriale

Bau der Plazenta die Voraussetzung, bei dem Chorionzotten in das Endometrium eindringen, ohne daß eine größere Zerstörung von mütterlichem Gewebe stattfindet. Chorionepithel und Schleimhautepithel liegen aneinander (KOLB 1967).

Auch beim Schaf bildet die Plazenta Progesteron. Diese plazentären Gestagene sind für die Aufrechterhaltung der Gravidität beim Mutterschaf ab dem 55. Tag verantwortlich (DENAMUR und MARTINET 1955, SHORT und MOORE 1959, LINDNER und Mitarb. 1964).

Beim Rind ist die Frage, ob die Plazenta Progesteron produziert, noch nicht geklärt. Während SHORT (1956), GORSKI et al. (1958) und GOMES und ERB (1965) in Rinderplazenten kein Progesteron nachweisen konnten, isolierten MELAMPY und Mitarb. (1959) größere Mengen (200 µg/kg Rinderplazenta) einer Verbindung, die sie ursprünglich für Progesteron hielten. BOWERMAN und MELAMPY (1962) konnten diesen Befund jedoch nicht bestätigen. In ihren Untersuchungen an 5 Plazenten konnten sie lediglich bei einer Plazenta Progesteron in einer Menge von 4,4 µg/kg Gewebe nachweisen. Weitere Untersuchungen mit verfeinerten und spezifischen Methoden scheinen notwendig, um diese Frage zu klären.

2.4. Progesteron während der Trächtigkeit bei landwirtschaftlichen Nutztieren

2.4.1. Rind

Zusammenfassend stellt CATCHPOLE (1969) für die Kuh fest, daß die Progesteronwirkung während der gesamten Dauer der Trächtigkeit von Bedeutung ist. Er stützt sich dabei auf Untersuchungen von ESTERGREEN und Mitarb. (1967). Diese beobachteten nach Ovariectomie bei 12 Kühen zwischen dem 48. und 117. Trächtigkeitstag einen Abort nach durch-

schnittlich 4 Tagen, bei 7 Kühen zwischen dem 139. und 174. Trächtigkeitstag einen Abort nach durchschnittlich 11 Tagen. Die Ergebnisse der Ovariectomien bei 21 Kühen, die zwischen dem 200. und 268. Trächtigkeitstag durchgeführt wurden, waren jedoch so uneinheitlich, daß eine genauere Aufgliederung notwendig erscheint.

Bei 6 Kühen, die zwischen dem 200. und 210. Trächtigkeitstag ovariectomiert wurden, kam es nach durchschnittlich 52 (13-74) Tagen zur Geburt, wobei 3 der Früchte lebten; bei 4 der 6 Muttertiere konnte von einer Schweregeburt gesprochen werden und bei allen 6 Tieren traten Retentiones secundinarum auf.

11 Kühe, die zwischen dem 226. und 236. Trächtigkeitstag ovariectomiert wurden, gebaren nach durchschnittlich 32 (4-59) Tagen. Es kamen 7 lebende Kälber zur Welt. Bei 9 der 11 Versuchskühe waren Abkalbeschwierigkeiten und bei allen 11 Tieren Retentiones zu verzeichnen.

Bei 4 Kühen, denen zwischen dem 251. und 268. Trächtigkeitstag die Ovarien entfernt wurden, trat die Geburt nach durchschnittlich 8 (2-21) Tagen ein. Mit Ausnahme bei einer Kuh kamen am 253., 270. und 272. Tag lebende Kälber zur Welt. Bei 2 Tieren kam es zur Geburtsschwierigkeiten und bei allen 4 zu Retentiones.

Aus diesen ihren Befunden schließen ESTERGREEN et al. (1967), daß das Corpus luteum graviditatis als Progesteronhauptquelle beim Rind bis zum 200. Tag der Trächtigkeit zur Aufrechterhaltung der Gravidität notwendig ist. Wird das Corpus luteum nach diesem Zeitpunkt entfernt, können zwar lebende Früchte geboren werden, es treten aber vermehrt verkürzte Trächtigkeiten, Totgeburten, abnormale Geburtsverläufe und Retentiones auf.

Mit diesen Untersuchungen bestätigen ESTERGREEN et al. (1967) die bereits 1953 von Mc DONALD und Mitarb. gemachten Befunde, daß Kühe nach Enukleation ab dem 207. Trächtigkeitstag lebende Kälber gebären können.

Um die quantitative Bedeutung des Progesterons für die Trächtigkeit klarer zu erkennen, wurden zahlreiche Versuche angestellt, in denen nach Enukleation oder Ovar-exstirpation das fehlende endogene Progesteron durch exogen zugeführtes Gestagen substituiert werden sollte.

In ihren Untersuchungen stellten TANABE und Mitarb. (1968) zunächst einen Zusammenhang zwischen Substitutionsdosis und Trächtigkeitsstadium fest. An 153 Kühen, die zwischen dem 30. und 270. Tag der Gravidität enukleiert wurden, wurde in 15-tägigem Abstand in 10 verschiedenen Dosierungen (0 bis 2,5 mg Progesteron/kg Körpergewicht) i.m. verabreicht. Es wurde für Tag 30 ein Maximum von 2,5 mg/kg Körpergewicht errechnet, dann abfallende Bedarfswerte, bis schließlich ein Minimalwert von 0 während der Tage 190-210 erreicht war. Für die Tage 225-270 wurden wiederum Werte zwischen 0-0,55 mg Progesteron pro kg Körpergewicht als notwendig errechnet.

Ähnliche Substitutionsversuche wurden von JOHNSON und ERB (1962) mit dem Gestagenpräparat Delalutin (17 α -Hydroxy-Progesteron-17-n-Caproat) unternommen. Die Tiere wurden zwischen dem 55. und 143. Trächtigkeitstag ovariektomiert. Eine Dosis von 125 mg Delalutin täglich i.m. - wenn bereits 8 Tage vor dem operativen Eingriff mit der Behandlung begonnen wurde - konnte ab dem 88. Tag der Trächtigkeit die Gravidität aufrechterhalten. In entsprechenden Untersuchungen mit Repositol-Progesteron (Progesteron in Propylenglycol) reichten tägliche Injektionen von 50 mg zur Aufrechterhaltung der Gravidität bei Ovariektomie ab dem 66. Trächtigkeitstag aus. Setzten sie die Medikation eher als 6 Tage vor dem erwarteten Geburtstermin ab, so gab es in allen Fällen Retentiones secundinarum. Mit wöchentlichen Gaben von 500 mg Repositol-Progesteron konnte die Trächtigkeit nicht aufrechterhalten werden (JOHNSON und ERB 1962).

Substitutionsversuche mit Progesteron unternahmen Mc DONALD und Mitarb. bereits 1952. Sie versuchten den Progesteronbedarf zwischen dem 30. und 180. Trächtigkeitstag beim Rind zu errechnen. Sie fanden Werte von 1,5 bis 2,0 mg Progesteron pro kg Körpergewicht zwischen dem 30. - 60. Trächtigkeitstag, 1,0 bis 1,2 mg Progesteron pro kg für die Tage 90 - 165 der Trächtigkeit und 0,25 mg Progesteron pro kg Körpergewicht für den 165. - 180. Trächtigkeitstag.

Dieser im Verlauf der Trächtigkeit festgestellte geringer werdende Gestagenbedarf zur Aufrechterhaltung der Gravidität - bis zum letzten Drittel - steht in Einklang mit den von ESTERGREEN et al. (1967) gemachten und bereits oben beschriebenen Beobachtungen, daß nach Enukleation oder Ovarexstirpation ab dem 200. Trächtigkeitstag lebende bzw. lebensfähige Früchte geboren werden können.

Kritisch scheint der Progesteronbedarf zum Zeitpunkt der Umstellung des Corpus luteum periodicum auf das Corpus luteum graviditatis zu sein. Diese Übergangsphase wurde von SHEMAH et al. (1968) untersucht. Sie bestimmten Progesteron mit einem gaschromatographischen Verfahren und schlossen aus ihren Untersuchungen an besamten und nichtbesamten Kühen, daß bei einer Konzentration von mindestens 3 ng/ml Plasma am 19. Tag nach der Besamung eine Konzeption stattgefunden hat und ein lebender Embryo vorliegt.

Bei Versuchen, die Verlaufskurve des endogenen Progesterons während der Trächtigkeit zu ermitteln, mußte man sich zunächst aufgrund der noch relativ unempfindlichen Methoden auf die Progesteronbestimmung im Corpus luteum-Gewebe beschränken.

In einer Zusammenfassung der bis 1965 in der Literatur angegebenen Werte (ZIMBELMAN et al. 1959 und 1961, STORMSHAK und ERB 1961, GOMES und Mitarb. 1962) stellten GOMES und ERB (1965) für Progesteron im Corpus luteum folgende Verlaufskurve auf:

Nach Eintritt der Trächtigkeit werden bis Tag 24 Werte von maximal 40 $\mu\text{g/g}$ Gewebe gemessen, die dann wieder absanken und zwischen dem 60. und 180. Trächtigkeitstag ein Plateau von ca. 20 $\mu\text{g/g}$ erreichten, um dann nochmals auf 30 $\mu\text{g/g}$ Gewebe anzusteigen und ab dem 250. Tag bis zur Geburt hin abzufallen.

Aus der Arbeit von STORMSHAK und ERB (1961) geht zusätzlich hervor, daß das Gewicht des Corpus luteum während der Trächtigkeit etwa konstant bleibt und keine Beziehung zur Progesteronkonzentration aufgestellt werden kann.

Erste Versuche, Progesteron im peripheren Plasma trächtiger Rinder zu messen, unternahmen SHORT (1957), BOWERMAN und MELAMPY (1962) und GOMES und Mitarb. (1962). Da Progesteron noch im UV-Spektrum gemessen wurde, waren demzufolge große Blutmengen - bis zu 500 ml - für eine Analyse notwendig. Die gemessenen Einzelwerte liegen zwischen 0,2 und 1,0 $\mu\text{g}/100$ ml Plasma und ergeben - zusammengestellt - eine den Progesteronwerten im Corpus luteum etwa parallel verlaufende Kurve (GOMES und ERB 1965).

In ihren Untersuchungen fanden ERB und Mitarb. (1968) keine direkte Beziehung zwischen Progesteronkonzentration im Plasma der Ovarvene und der Vena jugularis. Sie bestimmten Progesteron mittels einer Doppel-Isotopen-Derivat-Methode (DID). Die während der Trächtigkeit gemessenen Werte in der Ovarvene lagen bei $2,9 \pm 0,21$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ Plasma und in der Jugularvene bei $30,3 \pm 1,7$ ng/ml Plasma. Bei der Beurteilung der Werte von ERB et al. (1968) muß jedoch berücksichtigt werden, daß die von den Autoren zur Messung von Progesteron verwendete DID-Methode nach WOOLEVER und GOLDFIEN (1963) hohe Blindwerte aufweist, wie von HAGERMAN und WILLIAMS (1969) festgestellt worden ist. Diese Blindwerte liegen teilweise höher als die im peripheren Blutplasma tatsächlich vorhandene Progesteronkonzentration, so daß die für das periphere Blut ermittelten Werte nicht sehr aussagekräftig sind (siehe Kap.3.2.2.).

POPE et al. bestimmten 1969 mit einem spezifischen gaschromatographischen Verfahren die Progesteronkonzentration in der Anfangs- und Endphase der Trächtigkeit von 8 Kühen. Sie fanden in der Anfangsphase aufsteigende Werte von 1,5 ng/ml Plasma im Östrus auf 7,4 ng/ml Plasma am 13./14. Trächtigkeitstag bzw. 9,5 ng/ml Plasma am 20./21. Tag der Trächtigkeit. Während der Endphase der Trächtigkeit sinkt ab dem 250. Trächtigkeitstag der Progesteronblutspiegel von 7,5 - 10 ng bis auf 0,5 - 3 ng/ml Plasma kurz vor der Geburt ab.

Ebenfalls mit einem gaschromatographischen Verfahren bestimmten STABENFELDT und Mitarb. (1970) die Progesteronkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten der Trächtigkeit bei insgesamt 14 Kühen.

Ihre Befunde in der Anfangs- und Endphase bestätigen die von POPE und Mitarb. (1969) ermittelten Werte. Die zwischen dem 140. und 200. Trächtigkeitstag erhaltenen Plasmalogesteronwerte liegen durchschnittlich bei 4,6 ng/ml Plasma. Bis zum 250. Tag erfolgte dann ein kleiner Anstieg auf durchschnittlich 6,8 ng/ml, wonach die Progesteronkonzentration im peripheren Plasma allmählich wieder auf 4 ng/ml Plasma 10 Tage vor der Geburt absinkt. Ca. 24 Stunden vor der Geburt erfolgt ein Abfall der Werte auf weniger als 1 ng/ml Plasma. Dieser zunächst allmähliche und dann kurz vor der Geburt drastische Abfall von Progesteron wurde auch von KARG und Mitarb. (1970), die Progesteron mit einer Protein-Bindungsmethode bestimmten, gefunden.

2.4.2. Schaf

Um vieles einheitlicher und klarer als beim Rind sind die Folgen der Ausschaltung der Corpora lutea als Progesteronquellen beim Schaf. So erfolgt hier ein Abortieren nur, wenn die Ausschaltung dieser Progesteronquelle vor dem 55. Trächtigkeitstag erfolgt (DENAMUR und MARTINET 1955, SHORT und MOORE 1959, LINDNER und Mitarb. 1964). Frühere Versuche zeigten, daß Ovariectomien nach dem 66. Trächtigkeitstag sogar ohne meßbare Auswirkung auf die Progesterinkonzentration im Blut blieben (NEHER und ZARROW 1954). Beim Schaf tritt zu diesem Zeitpunkt die Plazenta als hauptsächliche Progesteronquelle in Aktion (siehe Kap. 2.3.3.).

Auch beim Mutterschaf wurden nach Ovarerectomie Substitutionsversuche mit Gestagenen durchgeführt. So ließ sich beim Schaf nach Ovariectomie in der Frühträchtigkeit ein Abort vermeiden, wenn in den ersten sechs Wochen täglich 0,15 mg Progesteron/kg Körpergewicht verabreicht wurde (MOORE und ROWSON 1959).

Im Verlauf der Gravidität übernimmt beim Schaf die Plazenta etwa ab dem 60. Tag die Hauptprogesteronproduktion. Neben Progesteron wird von ihr auch 20α -Hydroxy-Pregn-4en-3on produziert. Beide Gestagene werden etwa im Verhältnis von 1 : 1 sowohl in der Plazenta als auch im peripheren Blut nachgewiesen (SHORT und MOORE 1959).

Ein Anstieg der Progesteronwerte erfolgt in den Tagen 50 - 120 der Trächtigkeit (NEHER und ZARROW 1954) und zwar um das 2- bis 5 fache der Anfangswerte bis zu 13 ng pro ml Plasma (BASSETT und Mitarb. 1969). Somit gewinnt die plazentäre Sekretion gegenüber der ovariellen eindeutig die Oberhand, obgleich das Corpus luteum nach EDGAR und RONALDSON (1958) und LINDNER und Mitarb. (1964) weiterhin Progesteron produzieren soll. Eine fruchter-

haltende Wirkung kommt ihm jedoch nicht mehr zu, wie bereits oben beschrieben wurde. Vergleichsweise berechneten LINZELL und HEAP (1968) bei zwei Mutterschafen, die 119 - 126 Tage trächtig waren, eine tägliche Progesteronproduktion bis zu 14 mg für die Plazenta und von ca. 2 mg Progesteron für die Ovarien.

2.4.3. Ziege

Auch bei der Ziege, ist wie beim Rind, das Corpus luteum graviditatis die Hauptprogesteronquelle während der gesamten Graviditätsperiode. So abortiert die Ziege stets nach Corpus luteum-Entfernung, nach Ovariectomie (MEITES und Mitarb. 1951), als auch nach Hypophysektomie oder Hypophysenstieltrennung (COWIE und Mitarb. 1963).

Während der Gravidität wurde im Vergleich zu den Normalwerten der Lutealphase des Zyklus nur ein geringer Progesteronanstieg im Blut gemessen (HEAP und LINZELL 1966). Die Zykluswerte betragen $3,4 \pm 0,8$ ng/ml Plasma während des Anöstrus und Östrus und $10,7 \pm 2,2$ ng/ml Plasma während der Lutealphase des Zyklus. Im Vergleich dazu liegen die Werte der Gravidität bei 10 ng/ml Plasma in der zweiten und bei 15 ng in der fünften Trächtigkeitswoche. Der durchschnittliche Progesteronwert für die gesamte Trächtigkeit bei 8 untersuchten Ziegen betrug $12,2 \pm 0,7$ ng/ml Plasma.

Die gleichen Autoren berechneten für die Ziege eine tägliche Progesteronproduktion von ca. 10 mg in den Ovarien. Wie SHORT (1957) konnten auch sie plazentäres Progesteron nicht nachweisen, wobei berücksichtigt werden muß, daß die untere Nachweisgrenze ihrer Methode bei 0,8 ng/ml Plasma lag.

2.4.4. Pferd

Die Aufrechterhaltung der Stutengravidität bei einer Trächtigkeitsdauer von 330 - 345 Tagen ist bis zu den Tagen 150 - 200 der Trächtigkeit an das im Ovar produzierte Progesteron gebunden. Ovarexstirpationen vor dieser Zeit führen zum Abort (COLE und GOSS 1943, AMOROSO 1948). Über die besonderen Corpus luteum-Verhältnisse in diesem Zeitraum wurde bereits berichtet (siehe Kap. 2.3.1.).

Versuche zur Bestimmung von Progesteron im peripheren Blut wurden von verschiedenen Autoren unternommen. Dabei wurde festgestellt, daß Progesteron im peripheren Blut erfaßbar war, wenn ein vollentwickeltes Corpus luteum vorhanden war (SHORT 1959). Er maß bei 63-, 64-, 70- und 71-Tage trächtigen Stuten eine Plasmaprogesteronkonzentration von 0,5; 1,4; 1,1 und 1,3 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Plasma. Während der zweiten Trächtigkeitshälfte, in der die Ovarien fibrotische Konsistenz annehmen, konnte SHORT (1959) kein Progesteron mehr im peripheren Blut entdecken. So war in 500 ml Blut, entnommen aus der Vena jugularis jeweils am 120., 170., 222., 227., 305. und 310. Trächtigkeitstag, kein Progesteron meßbar.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der bisherigen Annahme, daß in der zweiten Trächtigkeitshälfte der Stute das plazentäre Progesteron ausschließlich lokale Wirkung auf den Uterus besitzt, ohne in die mütterliche Blutbahn zu treten (SHORT 1957). Auch in 410 ml Plasma aus Uterinvenenblut einer 258 Tage trächtigen Stute und in 1 Liter Amnion- und Allantoisflüssigkeit einer 200 Tage trächtigen Stute konnte kein Progesteron festgestellt werden. Um so ergiebiger war die Analyse von Stutenplazentagewebe (SHORT 1957). Es wurde um den 120. Tag eine Progesteronkonzentration von 73 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Plazentagewebe und um Tag 270 eine von ca. 250 μg ge-

messen. Eine kleinere Menge des biologisch aktiven Progesteronmetaboliten 20 β -Hydroxy-Pregn-4en-3-on konnte ebenfalls in Plazentagewebe identifiziert werden.

2.4.5. Schwein

Progesteron aus den bis zur Geburt funktionsfähigen und nicht zurückgebildeten Corpora lutea ist für die ganze Dauer der Gravidität des Mutterschweines von Bedeutung. Eine Ovarexstirpation während der gesamten 115-tägigen Tragezeit führt unweigerlich zum Abort (DU MESNIL DU BUISSON und DAUZIER 1957).

Bei Versuchen von DAY et al. (1959) und SPIES et al. (1960) an in der Frühgravidität ovariektomierten Mutterschweinen ließen sich zu keinem Zeitpunkt die Früchte mittels exogen zugeführter Gestagene erhalten.

Die Bestimmung von Progesteron im Gesamtovar wurde von ERB und Mitarb. (1962) an 67 Mutterschweinen durchgeführt, die sich zwischen dem 17. und 105. Trächtigkeitstag befanden. Dabei zeigte sich ein Anstieg von durchschnittlich 115,6 μ g Progesteron im gesamten Ovargewebe in den ersten Trächtigkeitstagen auf insgesamt 466,4 μ g Progesteron in den Tagen 24 - 35. Entsprechend stiegen die Konzentrationen von 9,5 μ g auf 28,8 μ g/g Gewebe. Während der Tage 36 - 46 blieben die Werte bei durchschnittlich 399,9 μ g Progesteron im Gesamtovar bzw. 23,7 μ g/g Gewebe, um dann einigermaßen linear bis zum 105. Trächtigkeitstag auf 28,5 μ g Progesteron im Gesamtovar bzw. auf 2,5 μ g/g Ovargewebe abzusinken.

In einer Studie verglichen MASUDA und Mitarb. (1967) die im Corpus luteum und im Blut der Ovarvene von Sauen in der Anfangsphase der Trächtigkeit erhaltenen Progesteron-

werte mit denen im Zyklus, der bei der Sau 21 Tage dauert. So war die Progesteronkonzentration im Corpus luteum 14 Tage nach Befruchtung fast doppelt so hoch wie zum gleichen Zeitpunkt des Zyklus, nämlich $65 \pm 3 \mu\text{g/g}$ Gewebe statt 41 ± 6 und stieg bis zum 18. Trächtigkeitstag sogar auf das 6-fache des entsprechenden Zyklostages an, auf 87 ± 8 im Vergleich zu einem Zykluswert von 15 ± 1 . Die Progesteronkonzentrationen in der Ovarvene trächtiger Mutterschweine zeigten bis zum 14. Tag nach der Konzeption mit $2,81 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$ Plasma einen steileren Anstieg als im entsprechenden Zeitraum des Zyklus. Der hier am 14. Tag gemessene Wert lag bei durchschnittlich $1,45 \pm 0,51 \mu\text{g}$ Progesteron/ml Plasma. In der Endphase der Trächtigkeit lagen die Werte zwischen Tag 102 und 110 nur mehr bei 1,44 bis $1,49 \mu\text{g/ml}$ Ovarvenenplasma und sanken am 112. Trächtigkeitstag auf $0,89 \mu\text{g/ml}$ Plasma. Ein Abfall der Progesteronwerte im Corpus luteum der Mutterschweine konnte in der Endphase der Trächtigkeit bereits ab dem 102. Tag der Gravidität gemessen werden (MASUDA und Mitarb. 1967).

Ebenfalls in der Anfangsphase, jedoch im peripheren Plasma maßen TILLSON und ERB (1967) die Progesteronkonzentration bei 12 trächtigen Schweinen. Sie stellten Progesteronkonzentrationen von $8,4 \text{ ng/ml}$ Plasma am 2. Trächtigkeitstag, $27,2 \text{ ng}$ am 12. bis 14. Tag (Maximalwert) und $17,8 \text{ ng}$ am 24. bis 25. Tag fest. Messungen zu späteren Zeitpunkten wurden von ihnen nicht durchgeführt.

3. METHODISCHER TEIL

3.1. Tiermaterial und Probennahme

Die Tierversuche wurden auf dem Versuchsgut Hirschau durchgeführt. Es standen uns 6 trächtige Fleckvieh-Kühe und 2 trächtige Fleckvieh-Kalbinnen zur Verfügung⁺).

Die Tiere befanden sich in zeitlich-verschiedenen Trächtigkeitsstadien und waren so ausgewählt, daß jeweils 4 Tiere aneinandergereiht eine volle Trächtigkeitsperiode bildeten (siehe auch Abb.6).

Dabei ergab sich folgender Versuchsansatz in der Probenentnahme vom 2.1.70 bis 10.4.70:

Kuh	entsprechend physiol.Zustand (Trächtigkeitstag)	Trächtigkeits- periode
Albi ("Ab")	12.-89.	I
Zista ("Zt")	82.-180.	
Alpiska ("Ap")	179.-237.	
Alante ("At")	220.-41.p.p.	
Zelline ("Ze")	7.-105.	II
Ella ("E")	51.-149.	
Zenzi ("Zn")	111.-209.	
Pola ("P")	206.-30.p.p.	

In der Trächtigkeitsperiode I wurde Progesteron im 4-Tage-Intervall bestimmt, während in der Trächtigkeitsperiode II Progesteron im 5-Tage-Intervall ermittelt wurde.

⁺) Herrn Prof.Dr. Kirchgeßner, Institut für Tierernährung, sei für die Ermöglichung der Untersuchungen bestens gedankt.

Die Blutprobenentnahmen wurden vorgenommen in der Zeit vom 2. Januar 1970 bis 10. April 1970, pro Tag viermal im 6-Stunden-Intervall um 4, 10, 16 und 22 Uhr. Abwechselnd wurde rechts und links die Vena jugularis punktiert und das Blut in zwei 15 ml-Zentrifugengläser aufgefangen. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurden vorher jedem Glas 50 μ l des Heparinpräparates Liquemin (Hoffmann-La Roche AG) zugegeben. Sofort nach Entnahme wurden die Blutproben bei ca. 2300 RPM zentrifugiert, das Plasma abgehebert und bei -18°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufgehoben.

3.2. Möglichkeiten zur quantitativen Messung von Progesteron in niedrigen Konzentrationsbereichen

Für die Messung von Progesteron bieten sich mehrere grundsätzliche Verfahren an.

3.2.1. UV-Messung

Über die α/β Konfiguration im A-Ring (das ist die Keto-gruppe am Kohlenstoffatom Nr. 3 und die Doppelbindung von Kohlenstoffatom Nr. 4 nach Nr. 5, siehe auch Abb. 1), die im UV-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 240 m μ aufweist, konnte Progesteron nach entsprechenden Extraktions- und Reinigungsschritten spezifisch gemessen werden. Da für eine solche Messung Progesteron jedoch in μg -Mengen vorliegen muß, erscheint es daher wenig sinnvoll, mit diesem Verfahren Progesteron im peripheren Blut messen zu wollen. Es eignet sich aber für die Bestimmung von Progesteron im Corpus luteum-Gewebe und Blut der Vena ovarica, wo Progesteron in entsprechend hohen Konzentrationen vorliegt.

3.2.2. Doppel-Isotopen-Derivat-Methode

WOOLEVER und GOLDFIEN beschrieben 1963 eine Doppel-Isotopen-Derivat-Methode für die Bestimmung von Progesteron im peripheren Blut der Frau. Dieses Verfahren wurde auch von PLOTKA und Mitarb. (1967) für die Bestimmung von Progesteron im peripheren Rinderblut angewandt. Wie jedoch inzwischen HAGERMAN und WILLIAMS (1969) mitteilen konnten, weist diese Methode hohe Blindwerte bis zu 40 ng auf, die bis jetzt nicht berücksichtigt wurden und teilweise um vieles höher liegen als die Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut. Aus diesem Grund wurde die Methode bei der Auswahl unseres Meßverfahrens nicht weiter in Erwägung gezogen.

3.2.3. Gaschromatographie

Ein weiteres Meßprinzip, das besonders bei Progesteron Anwendung gefunden hat, ist die gaschromatographische Messung von Steroidhormonen. Die zunächst verfügbaren Gaschromatographen waren mit Flammen-Jonisations-Detektoren ausgerüstet, deren Empfindlichkeitsgrenze im unteren μg -Bereich lag. Während für die gaschromatographische Bestimmung von Progesteron in Corpus luteum-Cysten-Gewebe wenige Gramm genügten (HOFFMANN 1969), mußten für 1 Progesteronbestimmung im peripheren Rinderblut bis zu 100 ml Blut entnommen werden, um in den Meßbereich zu kommen (HOFFMANN, persönliche Mitteilung).

Inzwischen wurde die Empfindlichkeit gaschromatographischer Messungen durch den Einsatz von Elektronen-Einfang-Detektoren erheblich erhöht. Die Meßgrenze liegt bei diesen Detektoren im unteren ng-Bereich und für eine Progesteronanalyse kann 1 ml Plasma genügen. Die Messung mit Elektronen-Einfang-Detektoren erfordert

jedoch komplizierte Extraktions- und Reinigungsschritte, sowie die Bildung eines Halogenderivates des zu messenden Steroids (GRANT 1967). Diese Methode wurde mit Erfolg beim Rind angewandt (STABENFELDT et al. 1970). Aufgrund des enormen Arbeitsaufwandes und nachdem Anfangsversuche im eigenen Labor keine positiven Ergebnisse gaben, wurde diese Methode nicht weiter bearbeitet.

3.2.4. Kompetitive Protein-Bindungsreaktion

Erfolgsversprechender erschien die Anwendung einer sogenannten kompetitiven Protein-Bindungsreaktion, nachdem sie für die Progesteronbestimmung beim Rind erstmals von HOFFMANN und KARG (1969) beschrieben und inzwischen näher mitgeteilt werden konnte (HOFFMANN und KARG 1970). Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Verfahren ist diese Methode relativ leichter durchführbar und es können bis zu 30 Proben pro Woche analysiert werden.

Aus diesen Gründen wurde die Methode der kompetitiven Protein-Bindungsreaktion, die nachstehend ausführlich beschrieben wird, für die Durchführung der Versuche gewählt.

3.3. Beschreibung des Verfahrens zur Bestimmung von Progesteron mittels einer kompetitiven Protein-Bindungsreaktion

3.3.1. Prinzip der Methode

Die Bindung von Steroidhormonen an Plasmaproteine wurde erstmals von EIK-NES und Mitarb. (1954) beschrieben. In zahlreichen weiteren Versuchsanstellungen wurden

Charakter und Art dieser Bindung untersucht. Es handelt sich dabei in allen Fällen um eine reversible koordinative Bindung.

Im Laufe dieser Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, daß die Affinität dieser Plasmaproteine zu den einzelnen Steroidhormonen nicht sehr spezifisch ist. Zu den spezifischeren Plasmaproteinen gehört die Gruppe der Sexualsteroidhormon-bindenden Globuline, die z. B. Testosteron und Östradiol binden, sowie das sogenannte Transcortin, das - soweit bekannt - aus der Gruppe der β -Globuline stammt und eine erhöhte Affinität zu den Glucocorticoiden, aber auch zu Progesteron aufweist. Auf diesen Bindungseigenschaften des Transcortins beruhen die Grundlagen der kompetitiven Protein-Bindungsreaktionen, wie sie von MURPHY et al. (1963) erstmals für Glucocorticoide vorgeschlagen wurden.

MURPHY et al. (1963) stellten fest, daß sich in einem "in vitro"-System Transcortin, freies Steroid und an Transcortin gebundenes Steroid in einem "dynamischen Äquilibrium" befinden. Wird nun diesem "in vitro"-System ein Steroidhormon zugesetzt, so muß sich ein neues Äquilibrium einstellen. Hierbei wird ein Teil des ursprünglich an Transcortin gebundenen Steroids aus seiner Verbindung verdrängt (siehe auch schematische Darstellung in Abb.3). Diese Verdrängung ist über einen bestimmten Größenbereich proportional der dem "in vitro"-System zugesetzten Steroidhormonmenge. Kann dieser Verdrängungsvorgang erfaßt werden, so können Rückschlüsse auf die Menge des zugesetzten Steroids gezogen werden. Dies wurde möglich, seit uns die aus ihrer Verbindung zu verdrängenden Steroidhormone in radioaktiv markierter Form vorliegen und eine quantitative Trennung der an Transcortin gebundenen und der freien Steroidhormone möglich ist.

Eine erste praktikable, aber noch begrenzt anwendbare Methode für die Glucocorticoidmessung wurde von MURPHY

et al. (1963) beschrieben. Die limitierenden Faktoren dieser ursprünglichen Methode bestanden darin, daß die spezifische Aktivität des zugegebenen markierten Corticosterons relativ niedrig war und die Trennung der gebundenen von den freien Steroiden zeitraubende Dialyseverfahren notwendig machten.

Diese Methodik konnte inzwischen verfeinert werden, nachdem einerseits radioaktiv markierte Steroidhormone von hoher spezifischer Aktivität im Handel sind und andererseits verschiedene Adsorbentien wie Fuller's Erde, Holzkohle, Florisil- MURPHY zeigte dies in ausgiebigen Studien 1967 - zur Schnelltrennung der gebundenen von den freien Steroiden eingeführt wurden. Außerdem wurde eine zusätzliche Verbesserung dieser Methodik durch eingehende Studien der Eigenschaften des Transcortins bei verschiedenen Tierarten und beim Mensch in die Wege geleitet (MURPHY 1967). Dabei zeigten die Bindungseigenschaften des Transcortins speziesbedingte Unterschiede. Somit kann Transcortin von verschiedenen Spezies verwendet werden, um die Fragestellung nach den einzelnen Steroidhormonen besser beantworten zu können (siehe Abb.3).

Aufbauend auf diesen Prinzipien beschrieben NEILL und Mitarb. (1967) eine detaillierte Methode zur Bestimmung von Progesteron im Blut der Frau mit der kompetitiven Protein-Bindungsmethode. In modifizierter Form wurde dieses Verfahren 1969 von HOFFMANN und KARG erstmals für die Progesteronbestimmung im peripheren Blut vom Rind angewandt.

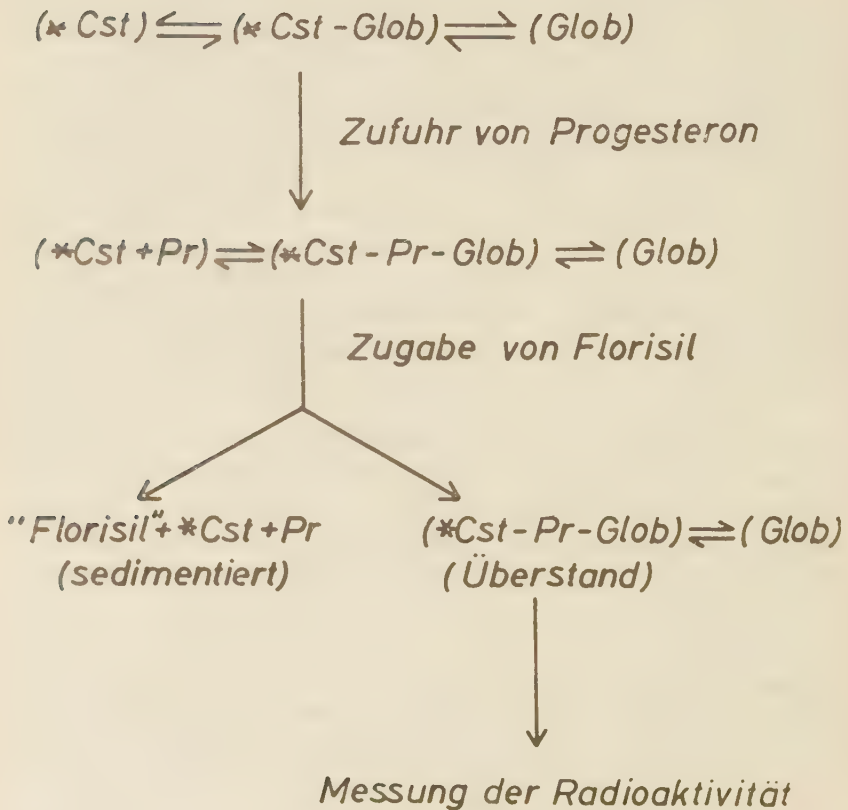
Durch Verwendung eines internen Standards zur Berechnung der Wiederfindung in den einzelnen Proben (HOFFMANN und KARG 1970), ähnlich wie es inzwischen auch von REEVES et al. (1970) beschrieben wurde, konnte die Methode weiterhin erheblich verbessert werden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit dem in diesem Bericht beschriebenen modifizierten Verfahren durchgeführt.

Abb. 3

Kompetitive Protein-Bindungsreaktion; schematische Darstellung

(Cst = Corticosteron, Pr = Progesteron, Glob = Globulin)



3.3.2. Material und Reagentien

Als besondere Glaswaren zur Progesteronbestimmung wurden 15ml-Zentrifugengläser mit Schliffstopfen für die Extraktion und 7,7 x 1,4 cm-Einweggläser für die Protein-Bindungsreaktion eingesetzt. Zum Abhebern des Petroläther-extraktes dienten Einweg-Pasteurpipetten.

Alle verwendeten Lösungsmittel, bis auf Dioxan (Merck: reinst) und Petroläther, waren p.A. Qualität und wurden vor Gebrauch destilliert. Der Petroläther (Siedebereich 50-70°C, p.A.) wurde einem speziellen Reinigungsverfahren unterworfen:

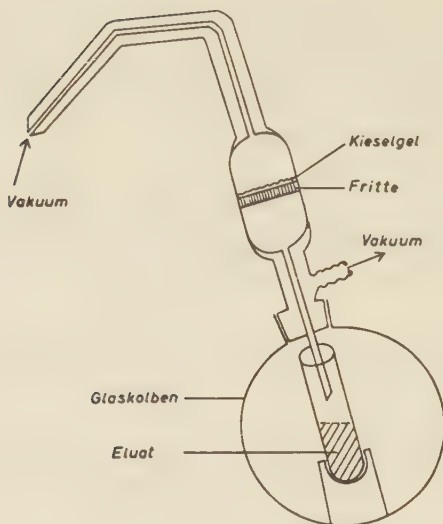
Nach dreimaliger Waschung mit konzentrierter Schwefelsäure (p.A.) wurde zweimal mit Aqua dest. und gesättigter Natriumbikarbonatlösung nachgewaschen. Danach wurde nochmals solange mit H₂O-dest. gewaschen, bis der pH-Wert des Aqua dest. (pH 6) erreicht war. Dies war meist nach 2-3 Waschungen der Fall. Der so gereinigte Petroläther wurde anschließend über "Calciumchlorid für Trocknungszwecke" (gekörnt) mindestens 12 Stunden getrocknet und dann destilliert. Die Fraktionen zwischen 54°C und 67°C wurden gesammelt.

Als Adsorbens für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel (MN-HR/ UV 254 μ m) verwendet. Dieses wurde vor Gebrauch mit Methanol gewaschen und dann bei 100°C getrocknet. Zur Beschichtung der Platten wurde dieses im Verhältnis 1 : 2 mit destilliertem Wasser gemischt. 20 x 20 cm-Glasplatten wurden mit einem Desaga-Streichgerät in einer Dicke von 0,2 mm beschichtet. Anschließend wurden die Platten 1 Stunde bei 110°C aktiviert.

Mit einem sogenannten Sweep-Eluter (siehe Abb.4) wurde das Kieselgel von der Platte auf eine G 4-Fritte abgesaugt und dann direkt eluiert.

Abb. 4

Sweep-Eluter



Das Florisil (aktiviertes Magnesiumsilikat, 60-100 Mesh, Fa. Schuchart München) wurde, wie bei NEILL et al. (1967) angegeben, im Labor dreimal in Aqua dest. aufgeschüttelt und nach Dekantierung des Überstandes 16 Stunden bei 100°C getrocknet.

Das Hundeplasma, das uns als Transcortinquelle diente, stammte von Blutspendehunden aus der Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München[†]). Das Blut wurde aus der Vena jugularis der nicht betäubten Hunde entnommen. Als Antikoagulans wurde wieder das Heparinpräparat "Liquemin" verwendet. Das Blut wurde nach der Entnahme gekühlt und im Labor bei 4°C zentrifugiert.

[†]) Wir bedanken uns bei Prof. Dr. Ullrich für das freundliche Entgegenkommen.

Die mit Tritium markierten radioaktiven Standardpräparate Corticosteron-1,2,-T (spezifische Aktivität 26,2 Ci/mM) und Progesteron-1 α ,2 α -T (spezifische Aktivität 41 Ci/mM) wurden vom Radiochemical Centre Amersham bezogen. Die Identität und radiochemische Reinheit der Präparate wurden durch Vergleichs- und Mischchromatogramme mit nicht markierten Standardsubstanzen festgestellt.

Die Scintillationsflüssigkeit (Bray's Solution) - bezogen auf 1 Liter Volumen - setzte sich, wie bei NEILL et al.(1967) angegeben, aus 7 g POP (2,5,-Diphenyloxazol), 0,3 g POPOP 1,4,-bis 2- (4-Methyl-5-Phenyloxazolyl) Benzol und 100 g Naphtalin (p.A., Merck), gelöst in 1 Liter Dioxan, zusammen.

Als Zählkuvetten wurden Niederdruck-Polyäthylen-Zählkuvetten der Fa. New England Nuclear verwendet.

Alle quantitativen Pipettiervorgänge wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Mikroliterpipetten-"Marburg" durchgeführt.

3.3.3. Extraktion

Ca. 2000 dpm ³H-Progesteron, gelöst ⁱⁿ 150 μ l Benzol/Äthanol 1 : 1, werden als interner Standard in das Extraktionsglas (ein 15ml-Zentrifugenglas mit Schliffstopfen) einpipettiert und unter einem Stickstoffstrom bei 40°C niedergetrocknet. Es wird dann 1 ml Plasma zugegeben, die Probe 1 Stunde unter wiederholtem Aufschütteln bei Zimmertemperatur stehen gelassen und über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Für die Extraktion wird dann 5 ml Petroläther zugegeben und die Probe genau 1 Minute lang gut durchgeschüttelt, kurz zentrifugiert und der Petrolätherüberstand, in dem sich das Progesteron befindet, in ein konisches 15 ml-Zentrifugenglas abgehebert. Der Extrakt wird im Stickstoffstrom niedergetrocknet, wobei die Glaswände einmal mit ca. 1 ml Petroläther nachgespült werden.

3.3.4. Reinigung und Trennung

Der niedergetrocknete Extrakt wird anschließend von mitextrahierten Verunreinigungen und die Protein-Bindungsreaktion mitbeeinflussenden Steroiden abgetrennt. Dies geschieht dünnsschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten in dem Lösungsmittelsystem Äthanol : Benzol = 2 : 1.

Die Dünnschichtplatten werden hierzu in 5 gleichgroße Lauflinien (1-5) unterteilt. Der niedergetrocknete biologische Extrakt wird nacheinander in jeweils 8, 6 und 4 Tropfen Chloroform aufgenommen und auf die Lauflinien 2 und 4 aufgetragen. Das Auftragen erfolgt in 5 nebeneinanderliegenden Punkten 2,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt. Auf die angrenzenden Lauflinien 1, 3 und 5 wird in gleicher Höhe eine Mischung von je 15 µg Standard-Progesteron und 17α -Hydroxy-Progesteron aufgetragen. Die Progesteronzone wird im UV-Licht durch den links und rechts mitlaufenden Progesteronstandard lokalisiert.

Das mitaufgetragene Standard-17α -OH-Progesteron soll zur Überprüfung des chromatographischen Reinigungs- und Trenneffektes auf jeder einzelnen Dünnschichtplatte dienen. Diese Abtrennung der die Protein-Bindungsreaktion ebenfalls beeinflussenden Steroide in obigem System wird durch die in Tab.1 dargestellten RF-Werte verdeutlicht.

Tab.1

Dünnschichtchromatographische Auftrennung
von Steroiden (Kieselgel / Benzol:Äther=1:2)

Steroide	RF-Werte
Corticosteron	0,08
Testosteron	0,33
17α -Hydroxy-Progesteron	0,38
20β- Hydroxy-Progesteron	0,39
Progesteron	0,57

Nach Markierung der Progesteronzone wird das Kieselgel mittels eines Sweep-Eluters (siehe Kap. 3.3.2., Abb.4) abgesaugt und mit 5 ml des Lösungsmittelgemisches Methanol-Chloroform (3 : 1) direkt in das Einweg-Reaktionsglas für die Protein-Bindungsreaktion eluiert. Das Eluat wird unter Stickstoff niedergetrocknet, mit 1 ml Methanol nachgespült, nochmals niedergetrocknet und erneut in genau 1 ml Methanol aufgenommen, wovon 0,1 ml zur Berechnung der Wiederfindung entnommen werden (siehe Kap. 3.3.5.). Der Rest der Probe wird für die Protein-Bindungsreaktion verwendet.

3.3.5. Eigentliche Protein-Bindungsreaktion

Wie bereits in Kap. 3.3.2. berichtet, wird Transcortin in Form von Hundeplasma verwendet. Unsere Transcortinlösung - bezogen auf 100 ml - wurde wie folgt angesetzt: 14,7 ng ^3H -Corticosteron, gelöst in 60 μl Äthanol/Benzol (1 : 1), wurden mit einer Lamdapipette in einen Erlenmeyerkolben einpipettiert und unter Stickstoff niedergetrocknet. Danach wurden 2,5 ml Hundeplasma zugegeben und mit Phosphatpuffer (pH 7,2; 0,15M + 0,005M NaN_3) auf 100 ml aufgefüllt.

Nach eigenen Erfahrungen zeigte diese Transcortinlösung bessere Eigenschaften im Test, wenn sie 1 Tag vor Gebrauch angesetzt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt wurde. Sie konnte so ohne negative Beeinflussung der Bindungskapazität bis zu 3 Tagen aufgehoben werden. Die Bindung des vorgelegten ^3H -Corticosterons lag bei durchschnittlich 68,8 % und schwankte je nach Hundeplasma von 63,2 % bis 72,5 %.

Die P r o t e i n - B i n d u n g s r e a k t i o n wird nach einem genau einzuhaltenden Zeitplan durchgeführt und läuft folgendermaßen ab:

1 ml der Transcortin-Lösung, die mit einem Magnetrührer leicht gerührt und deren Temperatur bei 4°C gehalten wird, wird dem niedergetrockneten Dünnschichteluat oder den Standardproben zugegeben, 10 Sekunden an einem Whirl-Mix geschüttelt und anschließend in ein Wasserbad von 45°C gebracht. Nach 2,5 Minuten wird erneut für 5 Sekunden aufgeschüttelt, nach 6 Minuten wird die Probe nochmal 10 Sekunden geschüttelt und für weitere 13 Minuten in ein Eisbad gestellt. Um die freien von den Transcortin-gebundenen Steroiden zu trennen, werden nun 80 mg Florisil zugegeben und die Probe 1 Minute lang an einem Laborrührer bei 400 Upm gerührt. Nach weiteren 6 Minuten im Eisbad - in dieser Zeit setzt sich das Florisil mit den daran adsorbierten freien Steroiden ab - werden 0,5 ml des Überstandes, in dem sich die an Protein gebundenen Steroide befinden, der Probe zur Bestimmung der Radioaktivität in eine Zählkuvette verbracht und 15 ml Scintillatorflüssigkeit zugegeben.

3.3.6. Messungen

3.3.6.1. Bestimmung der Radioaktivität

In allen Fällen wurden den einzelnen Proben 15 ml Scintillator (Bray's Solution) zugegeben (siehe auch Kap. 3.3.2.).

Diese Lösung konnte ohne Beeinflussung der Zählausbeute sowohl dem methanolischen 0,1 ml Aliquot zur Berechnung der Wiederfindung (siehe Kap. 3.3.6.2.) als auch dem wässrigen 0,5 ml Aliquot nach der Protein-Bindungsreaktion (siehe Kap. 3.3.5.) zugegeben werden.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte an einem Flüssigkeitsscintillationszähler Modell 3320 der Fa. Packard Instruments, bei dem ein Kanal auf optimale Tritium-Zählausbeute eingestellt war. Sie lag konstant bei 59 %,

so daß alle Berechnungen mit den gemessenen Impulsen "cpm" (counts per minute) durchgeführt werden konnten und auf eine Berechnung der tatsächlich vorhandenen Zerfallrate "dpm" (disintegration per minute) verzichtet werden konnte.

3.3.6.2. Berechnung der Wiederfindung

Wie bereits in Kap. 3.3.3. angegeben, wurde eine kleine Menge von ^3H -Progesteron (ca. 2000 cpm) von hoher spezifischer Aktivität (41 Ci/mM) als interner Standard den Proben vor der Extraktion zur genauen Berechnung der Wiederfindung in den einzelnen Proben zugegeben.

Der nach der Dünnschichtchromatographie entnommene aliquote Teil von 0,1 ml wird dreimal 10 Minuten im Flüssigkeitsszintillationsszähler gezählt, der Mittelwert berechnet und der Geräte-Background abgezogen. Nach Multiplikation dieses Wertes mit dem Faktor 9 erhält man die in der für die Protein-Bindungsreaktion verwendeten Restprobe noch vorhandenen Impulse, über die - nach Bezugnahme auf den anfangs zugesetzten internen Standard mit einer bekannten Impulsmenge - die Wiederfindung berechnet werden kann.

Sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{\text{noch vorhandene Menge cpm int.Stand.} \times 100}{\text{ursprünglich zugegebene Menge cpm int.Stand.}}$$

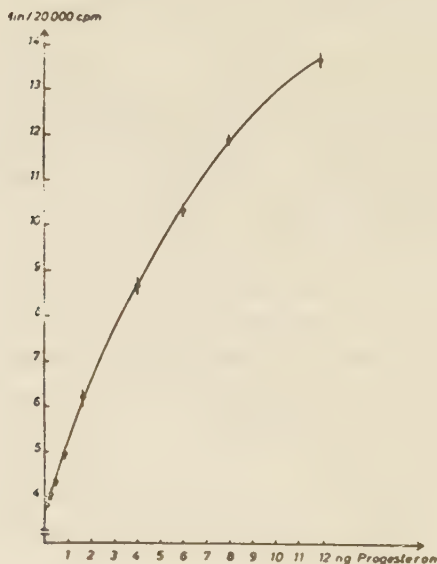
3.3.6.3. Berechnung der in der Probe tatsächlich vorhandenen Progesteronmenge

Die Berechnung der in den einzelnen Proben vorhandenen Progesteronmenge erfolgte über 2 Standardkurven, die bei jeder Versuchsreihe (20-40 Plasmaproben) aufgestellt

wurden. Die Werte dieser Kurven lagen zwischen 0 und 12,0 ng. Eine dieser Standardkurven gibt Abb.5 wieder.

Abb. 5

Progesteron - Standardkurve



Damit der durch den internen Standard entstehende Meßfehler in den biologischen Proben ausgeglichen wird, wurde den Eichpunkten in den Standardkurven $\frac{2}{3}$ des den Plasma-proben zugegebenen internen Standards zugesetzt. Dieser Faktor ergab sich aus der allgemeinen Wiederfindungsrate von 60 - 70 %.

Um eine einheitliche Zählstatistik zu erhalten, wurden von jeder Probe 20 000 Impulse gemessen. Dementsprechend wurde in den Standardkurven auf der Ordinate die Menge des gebundenen Progesteron nicht in %Bindung, sondern indirekt in Zeit pro 20 000 Impulse angegeben. Nach Ablesen des Wertes für jede einzelne Probe wurde dieser mit dem entsprechenden Wiederfindungsfaktor korrigiert und die Menge in ng Progesteron/ml Plasma angegeben.

3.3.7. Beurteilungskriterien

3.3.7.1. Empfindlichkeit

Aus den Standardkurven (siehe auch Abb.5) ist ersichtlich, daß 0,2 ng noch ziemlich genau gemessen werden können. Doch da der Reagentienleerwert, der routinemäßig überprüft wurde, zwischen 0 und 0,2 ng schwankte, wurde die untere Meßgrenze auf 0,4 ng festgesetzt.

3.3.7.2. Genauigkeit und Reproduzierbarkeit

Entsprechend dem in Kap. 3.3.5. angegebenen Zeitschema wurden in einer Versuchsreihe 20-40 Proben hintereinander getestet. Da am Anfang und Ende jeden Tests eine Standardkurve aufgestellt wurde, stellte jede Versuchsreihe eine in sich geschlossene Einheit dar.

Die Genauigkeit dieser Methode konnte zunächst in Zusatzversuchen mit kaltem Progesteron (0,8; 1,6; 4,0 und 6,0 ng), das 1 ml Bullenplasma zugegeben wurde, gezeigt werden. In 30 Bestimmungen wurde der Zusatz mit einem Fehler von weniger als 10 % wiedergefunden. Das Ergebnis eines dieser Zusatzversuche ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab.2

Zusatzversuch mit kaltem Progesteron

Zusatz ng Progesteron (Doppelbestimmungen)	wiedergefundenes Progesteron in ng	
	Wert 1	Wert 2
0,8	0,65	0,9
1,6	1,5	1,8
4,0	4,1	4,25
6,0	5,7	5,9

Ferner wird diese Genauigkeit durch den Wert von $\pm 3,3 \%$, der für die Standardabweichung von 100 Doppelproben errechnet wurde, unterstrichen.

Die gute Reproduzierbarkeit der Methode ergibt sich aus wiederholten Untersuchungen von Plasmaproben zu verschiedenen Zeitpunkten, wie aus Tab.3 ersichtlich ist:

Wiederholte Testung von Plasmaproben

Tab.3

Kuh	Plasmaprobe Trächt.tag	ng Progesteron/ml Plasma 1. Test	2. Test	zeitlicher Abstand
"Ab"	52.	7,3	7,3 u. 7,8	14 Wochen
	76.	8,0	7,8 u. 8,5	"
"Ap"	203.	6,1 u. 6,3	5,8	8 Wochen
	207.	6,7 u. 6,4	6,2	"
	211.	4,3 u. 4,7	4,8	"
"At"	3.Tag p.p.	1,4 u. 1,0	1,1 u. 0,8	3 Wochen
	5.Tag p.p.	1,8 u. 1,5	1,6 u. 1,6	"

3.3.7.3. Spezifität

Die hohe Spezifität der Methode wird durch folgende Tatsachen unterstrichen:

1. Die im vorliegenden Versuch erhaltenen Progesteronmesswerte während verschiedener Trächtigkeitsstadien liegen im gleichen Größenbereich wie die von anderen Autoren mit einem gaschromatographischen Verfahren erhaltenen Werte (POPE et al. 1969, STABENFELDT et al. 1970).
2. Im Parallelversuch wurde in einer Plasmaprobe einer trächtigen Kuh Progesteron mit einem gaschromatographischen Verfahren und der Protein-Bindungsmethode gemessen. Der gaschromatographisch ermittelte Wert lag bei 6,12 ng pro ml Plasma, in guter Übereinstimmung dazu lag der mit der Protein-Bindungsmethode erhaltene Wert bei 5,8 ng pro ml Plasma (HOFFMANN und KARG 1969).
3. Die Spezifität der Methode bestätigen ferner der niedrige Reagentienleerwert sowie die Zusatzversuche (s.Kap.3.3.7.2.).

4. E R G E B N I S S E

Wie bereits im methodischen Teil geschildert, wurde der Progesteronspiegel an 2 Kalbinnen und 6 Kühen untersucht, die insgesamt 2 komplette Trächtigkeitsperioden repräsentieren (siehe Abb.8). Von den gewonnenen und aufbewahrten Plasmaproben wurden zur Progesteronbestimmung - soweit nicht anders angegeben - die 16 Uhr-Proben eines jeden 4. bzw. 5. Tages herangezogen.

Bei interessant erscheinenden Phasen, in denen, wie aus Parallelversuchen hervorging (siehe FISCHER 1971), ein LH-Anstieg während der Trächtigkeit gemessen wurde, und um den Geburtstermin sowie im Puerperium, in dessen Endphase ebenfalls erste LH-Peaks gefunden wurden, ist in kürzeren Abständen (24 bzw. 12-Stunden-Intervall) Progesteron bestimmt worden.

4.1. Anfangsphase der Trächtigkeit (erstes Drittel)

Die Progesteronwerte der Kalbin "Ab" steigen bei Beginn der Trächtigkeit von 0,4 ng/ml Plasma am Tage der Besamung mit der Entwicklung des Corpus luteum auf 7,5 ng pro ml Plasma am 16. und weiter auf 12,4 ng am 20. Trächtigkeitstag an. Nach diesem Gipfelwert sinkt die Konzentration auf 7,6 ng am 24. und 5,9 ng am 28. Tag der Gravidität. Nach einem erneuten Anstieg auf 11,0 ng am 32. Trächtigkeitstag bleibt der Progesteronspiegel für die ersten 80 Tage der Gravidität auf einer Höhe zwischen 7,5 und 10,6 ng. Die Einzelwerte sind in Tab.4 auf Seite 42 dargestellt.

Tab.4

Kalbin "Ab" (1. Trächtigkeitsdrittel, Tag 1 - 84)
 Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
0 (Tag der Besamung)	0,2	0,7	0,45
4.	0,15	0,3	0,22
8.	3,8	4,6	4,2
12.	6,0	5,3	5,65
16.	7,2	7,9	7,55
20.	12,1	12,7	12,4
24.	7,2	8,0	7,6
28.	6,4	5,4	5,9
32.	10,5	11,6	11,0
36.	9,1	8,4	8,75
40.	8,0	-	-
44.	8,3	-	-
48.	9,0	-	-
52.	7,3	7,8	7,55
56.	8,6	-	-
60.	9,3	-	-
64.	10,9	10,4	10,65
68.	9,1	-	-
72.	9,7	-	-
76.	8,5	7,8	8,15
80.	8,2	-	-
84.	8,5	-	-

Tab.5

Kalbin "Ze" (1. Trächtigkeitsdrittel, Tag 7 - 101)

Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;

Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
7.	4,7	4,3	4,5
11.	7,5	6,7	7,1
16.	7,8	7,2	7,5
21.	10,2	9,7	9,95
26.	7,7	7,4	7,55
31.	6,7	6,3	6,5
36.	8,2	7,6	7,9
41.	7,7	7,4	7,55
46.	7,6	8,0	7,8
51.	8,8	8,0	8,4
56.	7,4	7,9	7,65
61.	8,7	8,9	8,8
66.	8,3	7,5	7,9
71.	8,7	7,7	8,2
76.	7,9	9,3	8,6
81.	9,7	9,0	9,35
86.	7,8	8,9	8,35
91.	9,3	9,8	9,55
96.	8,0	7,5	7,75
101.	8,0	6,8	7,4

Ähnlich war das Bild der Progesteronverlaufskurve in der Anfangsphase der Trächtigkeit bei der Kalbin "Ze", wie aus den in Tab.5, Seite 43, angeführten Einzelwerten sichtbar wird. Bei dieser Kalbin wurde ein erster Gipfelwert am 21. Trächtigkeitstag mit 9,9 ng/ml Plasma gemessen. Die Konzentration fiel dann auf 6,5 ng am 31. Trächtigkeitstag ab, lag aber am 36. Trächtigkeitstag bereits wieder bei 7,9 ng/ml Plasma. Die Progesteronkonzentration im peripheren Blut schwankte dann zwischen 7,4 und 9,5 ng bis zum 101. Trächtigkeitstag. Bei beiden untersuchten Tieren war die Umstellungsphase vom Corpus luteum periodicum zum Corpus luteum graviditatis durch Progesteronwerte über 7 ng/ml Plasma zwischen den Tagen 16 bis 24 bzw. 26 gekennzeichnet (siehe auch Abb.8).

4.2. Mittelphase der Trächtigkeit (zweites Drittel)

In dieser Phase wurden an insgesamt 4 Tieren, den Kühen "Zt", "Ap", "E" und "Zn", Progesteronbestimmungen durchgeführt. Die Untersuchungen erstreckten sich vom 90. bis 220. und in einem Fall bis zum 240. Trächtigkeitstag. Die Einzelwerte sind in den Tab. 6-9 auf den Seiten 45-48 angegeben. Wie die Daten zeigen, schwanken die Werte in dieser Phase zwischen 4,2 und 9,3 ng/ml Plasma. Es zeigen sich jedoch, wie auch aus Abb.8 deutlich wird, größere individuelle Unterschiede. So schwanken die Progesteronwerte besonders bei den Kühen "Zt" und "Ap", wo sie zwischen 4,2 und 8,4 ng bzw. 4,4 und 7,0 ng/ml Plasma liegen. Nur geringe Schwankungen zeigen sich hingegen bei den beiden anderen Kühen ("E" und "Zn"). Hier zeigt der Progesteronblutspiegel einen kontinuierlichen Verlauf. Die gemessenen Progesteronkonzentrationen liegen zwischen 7,0 und 9,3 ng bei der Kuh "E" und 5,9 und 8,0 ng/ml Plasma bei der Kuh "Zn".

Bei diesen 2 Tieren fällt auch auf, daß die absoluten Progesteronwerte bei der Kuh "E" durchschnittlich um 1,7 ng/ml Plasma höher liegen als bei der Kuh "Zn", wie aus Abb.8 deutlich wird.

Kuh "Zt" (2. Trächtigkeitsdrittel, Tag 82-180) Tab.6
 Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
82.	4,4	4,0	4,2
84.	3,8	4,0	3,9
88.	5,0	4,4	4,7
92.	5,1	5,0	5,05
96.	7,6	7,1	7,35
100.	6,9	6,2	6,55
104.	5,4	5,0	5,2
108.	6,6	6,3	6,45
112.	5,7	5,9	5,8
116.	7,0	-	-
120.	4,7	5,3	5,0
124.	5,3	-	-
128.	7,7	8,3	8,0
132.	6,3	7,1	6,7
136.	5,6	5,4	5,5
140.	6,2	7,4	6,8
144.	4,5	-	-
148.	5,8	-	-
152.	4,0	4,4	4,2
156.	4,8	-	-
160.	7,0	7,6	7,3
164.	8,4	-	-
168.	8,3	7,5	7,9
172.	6,6	6,1	6,35
176.	5,8	5,6	5,7
180.	6,0	-	-

Tab.7

Kuh "Ap" (2. Trächtigkeitsdrittel, Tag 179 - 237)

Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;

Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
179.	4,9	5,9	5,4
183.	4,5	4,7	4,6
187.	5,3	5,5	5,4
191.	5,7	6,0	5,85
195.	5,2	5,5	5,35
199.	7,3	6,8	7,05
203.	6,1	6,3	6,2
207.	6,4	6,7	6,55
211.	4,7	4,2	4,45
215.	4,15	4,85	4,5
219.	6,3	5,2	5,75
223.	5,7	5,3	5,5
227.	4,9	4,9	4,9
231.	5,1	5,4	5,25
235.	5,4	5,9	5,65
237.	5,5	6,2	5,85

Tab.8

Kuh "E" (2. Trächtigkeitsdrittel, Tag 99 - 149)
 Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
99.	8,5	7,0	7,75
104.	9,0	8,1	8,55
109.	7,6	8,5	8,05
114.	7,7	6,5	7,1
119.	9,7	8,8	9,25
124.	8,2	9,0	8,6
129.	7,2	6,8	7,0
134.	8,9	9,7	9,3
139.	8,1	8,5	8,3
144.	9,7	8,4	9,05
149.	9,5	8,1	8,8

Tab.9

Kuh "Zn" (2. Trächtigkeitsdrittel, Tag 149 - 209)
 Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
149.	6,8	5,9	6,35
154.	6,0	5,7	5,85
159.	5,4	6,3	5,85
164.	6,0	5,9	5,95
169.	6,0	6,6	6,3
174.	5,9	7,2	6,55
179.	6,2	7,1	6,65
184.	8,0	7,5	7,75
189.	6,9	8,5	7,7
194.	7,4	6,3	6,85
199.	7,8	8,2	8,0
204.	7,0	5,8	6,4
209.	6,5	6,3	6,4

4.3. Letztes Trächtigkeitsdrittel bis 10 Tage vor Geburt

Die Progesteronwerte im peripheren Plasma wurden in dieser Phase der Trächtigkeit bei den Kühen "At" und "P" ermittelt. Starke Schwankungen zwischen den einzelnen Progesteronwerten kennzeichnen den Verlauf des Progesteronblutspiegels der Kuh "At" zwischen dem 220. und 260. Trächtigkeitstag, wie dies aus den in Tab.10 auf Seite 50 angegebenen Einzelwerten und auch aus Abb.8 deutlich wird. Der niedrigste Progesteronwert lag bei 6,1 ng, der höchste Wert bei 10,0 ng/ml Plasma.

Im Gegensatz dazu zeigt der Progesteronspiegel der Kuh "P" (Einzelwerte in Tab.11, Seite 51) einen geradezu ruhigen Verlauf. Von 9,3 ng am 209. Trächtigkeitstag fällt die Progesteronkonzentration allmählich und ohne nennenswerte Schwankungen bis 6,8 ng/ml Plasma am 259. Tag der Gravidität ab.

4.4. Progesteronwerte in der Vorgeburts- und Geburtsphase und im Puerperium

Näher untersucht wurde die Vorgeburts-, Geburts- und Puerperalphase der Kühe "At" und "P". Bei der Kuh "At" wurde vom 264. Trächtigkeitstag bis 13. Tag post partum jeden zweiten Tag 1 Plasmaprobe, bei der Kuh "P" vom 264. Trächtigkeitstag bis 9. Tag post partum täglich 1 Plasmaprobe analysiert. Die Kuh "At" brachte am 277. Trächtigkeitstag bei normal beendeter Tragezeit und die Kuh "P" am 274. Tag der Trächtigkeit nach Injektion von 10 mg Flumethason (Cortexilar, Grünenthal) ein lebensfähiges Kalb zur Welt.

In den Tagen 264-274 vor den Geburten zeigten sich bei Kuh "At" mit 6,5 bis 7,1 ng/ml Plasma einigermaßen gleichmäßige Progesteronwerte, bei der Kuh "P" lagen sie im Trächtigkeitszeitraum 265 - 272 ziemlich konstant zwischen 4,9 und 5,3 ng/ml Plasma.

Tab.10

Kuh "At" (3. Trächtigkeitsdrittel, Tag 220 - 260)
Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;
Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
220.	8,9	10,0	9,45
224.	7,1	6,8	6,95
228.	8,4	7,6	8,0
232.	5,9	6,4	6,15
236.	7,1	6,0	6,55
240.	9,1	8,3	8,7
244.	6,8	6,0	6,4
248.	9,6	10,4	10,0
252.	7,6	7,3	7,45
256.	6,4	5,9	6,15
260.	8,2	9,0	8,6

Tab.11

Kuh "P" (3. Trächtigkeitsdrittel, Tag 209 - 259)
 Progesteronkonzentration im peripheren Plasma;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

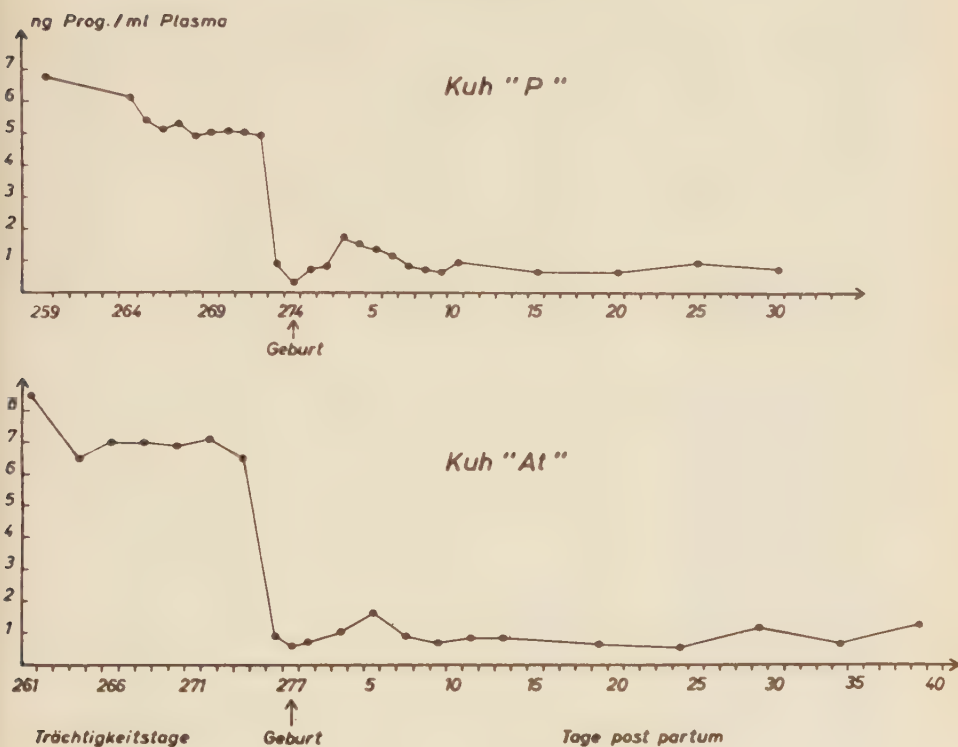
Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
209.	8,9	9,8	9,35
214.	10,0	8,3	9,15
219.	10,1	8,6	9,35
224.	8,5	9,4	8,95
229.	8,8	8,2	8,5
234.	9,2	8,5	8,85
239.	7,1	7,5	7,3
244.	6,9	6,6	6,75
249.	7,6	7,0	7,3
254.	5,7	6,1	5,9
259.	6,4	7,2	6,8

Der steile Abfall der Progesteronkonzentration kurz vor Geburt ist bei beiden Tieren klar erkennbar. Sie fiel bei der Kuh "At" von 6,6 ng am 274. auf 1,1 ng am 276. Trächtigkeitstag. Der Progesteronwert am Tag der Geburt selbst lag bei 0,7 ng/ml Plasma, stieg am 3. und 5. Tag post partum geringgradig auf 0,9 und 1,6 ng an und schwankte dann bis zum 39. Tag post partum (Ende der Messungen) zwischen 0,5 und 1,2 ng/ml Plasma.

Ähnlich waren die Verhältnisse bei der Kuh "P". Hier fiel die Progesteronkonzentration im peripheren Plasma von ca. 5 ng am 272. Trächtigkeitstag auf 0,9 ng 1 Tag vor der Geburt (273. Tag) ab. Sie lag bei 0,3 ng Progesteron am Tag der Geburt und bei 1,7 ng am 3. Tag post partum. Die Konzentration sank dann wieder ab und verlief zwischen dem 5. und 30. Tag post partum zwischen 0,6 und 1,3 ng/ml Plasma.

Erste LH-Peaks gegen Ende des Puerperiums (FISCHER 1971) standen nicht im Zusammenhang, wie auch aus Abb.6 deutlich wird, mit Veränderungen in der Progesteronkonzentration. Der Verlauf des Progesteronblutspiegels um die Geburt ist für beide Tiere teilweise in Abb.8, im Detail jedoch in Abb.6 dargestellt; die Einzelwerte finden sich in Tab.12 (Seite 54) und Tab.13 (Seite 55).

Progesteronwerte in der Vorgeburts- und Geburtsphase
und im Puerperium zweier Kühe



Tab.12

Kuh "At" (264. Trächtigkeitstag - 39. Tag p.p.)
 Progesteronwerte in der Vorgeburts- und Geburtsphase
 und im Puerperium;

Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeitst- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
264.	6,0	7,1	6,55
266.	6,9	7,4	7,15
268.	6,5	7,6	7,05
270.	6,7	7,1	6,9
272.	6,9	7,3	7,1
274.	7,0	6,2	6,6
276.	1,1	1,0	1,05
277. (Geburt)	0,6	0,9	0,75
1. Tag p.p.	0,6	1,0	0,8
3. Tag p.p.	1,1	0,8	0,95
5. Tag p.p.	1,8	1,5	1,65
7. Tag p.p.	1,1	0,8	0,95
9. Tag p.p.	0,6	0,8	0,7
11. Tag p.p.	0,7	1,0	0,85
13. Tag p.p.	1,2	0,5	0,85
19. Tag p.p.	0,7	0,6	0,65
24. Tag p.p.	0,6	0,4	0,5
29. Tag p.p.	1,3	1,0	1,15
34. Tag p.p.	0,6	0,6	0,6
39. Tag p.p.	1,3	1,1	1,2

Tab.13

Kuh "P" (264. Trächtigkeitstag - 30. Tag p.p.)
 Progesteronwerte in der Vorgeburts- und Geburtsphase
 und im Puerperium;

Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

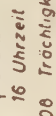
Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
264.	6,5	5,7	6,1
265.	5,2	5,5	5,35
266.	5,0	5,2	5,1
267.	5,0	5,5	5,25
268.	5,1	4,7	4,9
269.	5,3	4,8	5,05
270.	4,9	5,3	5,1
271.	5,4	4,8	5,1
272.	5,2	4,7	4,95
273.	1,1	0,8	0,95
274. (Geburt)	0,5	0,1	0,3
1. Tag p.p.	0,5	0,8	0,65
2. Tag p.p.	1,0	0,6	0,8
3. Tag p.p.	1,9	1,5	1,7
4. Tag p.p.	1,3	1,6	1,45
5. Tag p.p.	1,0	1,7	1,35
6. Tag p.p.	1,2	0,9	1,05
7. Tag p.p.	0,8	0,8	0,8
8. Tag p.p.	0,7	1,0	0,85
9. Tag p.p.	0,8	0,6	0,7
10. Tag p.p.	0,8	1,0	0,9
15. Tag p.p.	0,6	0,5	0,55
20. Tag p.p.	0,5	0,7	0,6
25. Tag p.p.	0,8	1,0	0,9
30. Tag p.p.	0,9	0,7	0,8

4.5. Progesteronwerte aus Trächtigkeitsstadien mit LH-Anstieg

Wie Paralleluntersuchungen ergaben (FISCHER 1971), wurden zu einigen Zeitpunkten der Gravidität erhöhte LH-Werte im peripheren Blut gemessen. Dies war der Fall bei der Kuh "Ap" am 206. Trächtigkeitstag und bei der Kuh "Zt" am 94. und 103. Trächtigkeitstag. Um festzustellen, ob dieser LH-Anstieg durch eine vorhergehende Änderung im Progesteronblutspiegel provoziert wurde oder in einer nachfolgenden Erhöhung des Progesteronblutspiegels resultierte, wurde Progesteron in kürzeren Zeitabständen d.h. einmal pro Tag (Kuh "At") bzw. zweimal pro Tag (Kuh "Zt") bestimmt.

Der Verlauf des Progesteronblutspiegels vor und nach LH-Anstiegen ist in Abb. 7 dargestellt, die Einzelwerte sind in den Tab. 14 (Seite 58) und 15 (Seite 58 und 59) angegeben. Aus der Abbildung und den in den Tabellen angegebenen Einzelwerten ist eine wesentliche von der üblichen Verlaufskurve stark abweichende Veränderung des Progesteronblutspiegels nicht zu erkennen; leichte Anstiegstendenzen im Progesteronblutspiegel, wie sie bei der Kuh "Zt" nach Tag 94 festgestellt wurden, schließen aber solche Beziehungen nicht aus.

Um bei der Vielzahl der angeführten Einzelwerte eine Übersicht zu gewinnen, wurden die Werte der einzelnen Trächtigkeitsphasen zusammenfassend in Abb. 8 (Seite 60) graphisch dargestellt.



Tab.14

Kuh "Ap" (203. - 211. Trächtigkeitstag)
 Progesteronkonzentration im peripheren Plasma bei
 LH-Anstieg während der Gravidität;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
203.	6,1	6,3	6,2
204.	6,0	5,2	5,6
205.	6,2	5,8	6,0
206. [†])	5,2	5,7	5,45
207.	6,4	6,7	6,55
208.	5,7	5,3	5,5
209.	5,7	6,1	5,9
210.	4,5	5,3	4,9
211.	4,7	4,2	4,45

[†]) Probe, in der ein LH-Peak festgestellt wurde
 (FISCHER 1971).

Tab.15

Kuh "Zt" (92. - 108. Trächtigkeitstag)
 Progesteronkonzentration im peripheren Blut bei
 LH-Anstieg während der Gravidität;
 Wert 1 und 2 (Doppelbestimmung), Mittelwert

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
92. 5 Uhr	5,0	-	-
16 Uhr	5,1	5,0	5,05
93. 5 Uhr	5,3	-	-
16 Uhr	5,7	5,6	5,65

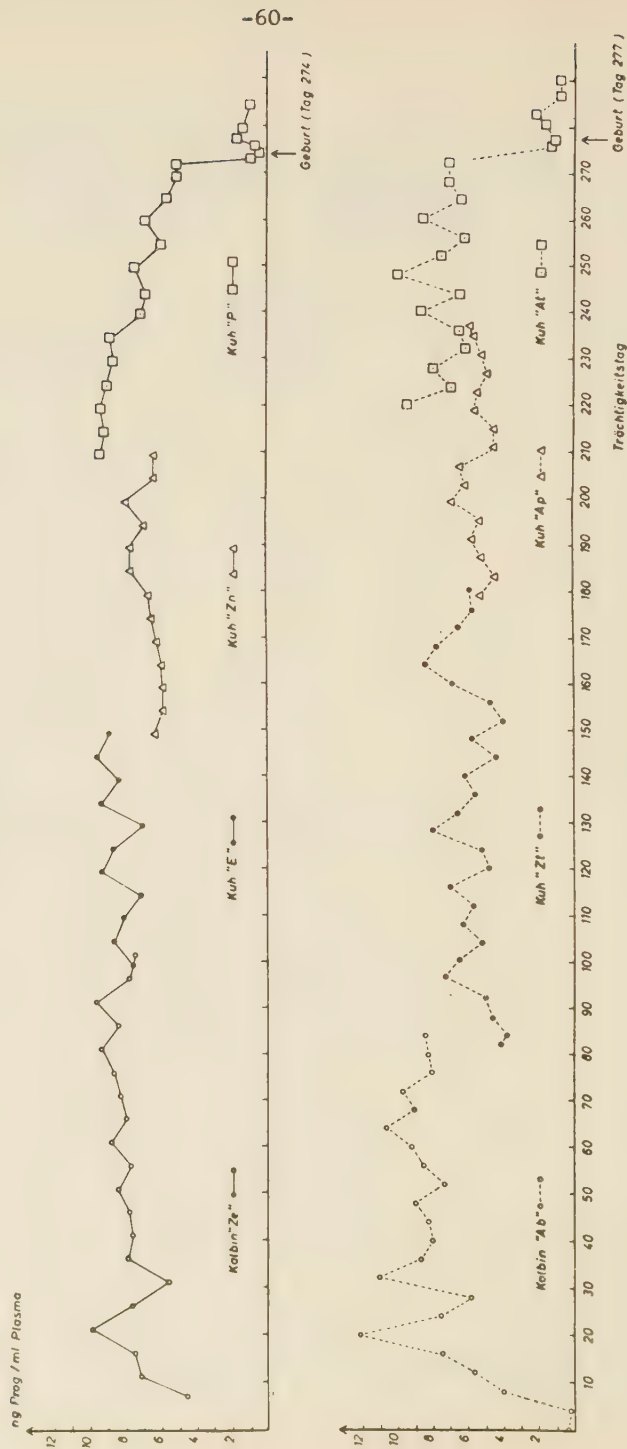
Fortsetzung Tab.15

Trächtigkeits- tag	Progesteronkon- zentration (ng/ml Plasma)		Mittelwert
	Wert 1	Wert 2	
94. 5 Uhr ⁺)	5,2	-	-
16 Uhr	5,7	6,3	6,0
95. 5 Uhr	6,1	-	-
16 Uhr	5,5	5,9	5,7
96. 5 Uhr	7,1	-	-
16 Uhr	7,6	7,1	7,35
97. 5 Uhr	6,5	-	-
16 Uhr	6,8	6,2	6,5
98. 5 Uhr	7,1	-	-
16 Uhr	6,8	7,1	6,95
99. 5 Uhr	6,5	-	-
16 Uhr	6,2	6,6	6,4
100. 5 Uhr	6,0	-	-
16 Uhr	6,9	6,2	6,55
101. 5 Uhr	5,9	-	-
16 Uhr	6,0	5,5	5,75
102. 5 Uhr	5,5	-	-
16 Uhr	5,4	5,2	5,3
103. 5 Uhr ⁺)	5,0	-	-
16 Uhr	4,9	4,5	4,7
104. 5 Uhr	5,5	-	-
16 Uhr	5,4	5,0	5,2
105. 5 Uhr	6,0	-	-
16 Uhr	5,4	5,9	5,65
106. 5 Uhr	5,5	-	-
16 Uhr	5,7	5,5	5,6
107. 5 Uhr	6,6	-	-
16 Uhr	6,2	6,7	6,45
108. 5 Uhr	6,2	-	-
16 Uhr	6,6	6,3	6,45

⁺) Proben, in denen LH-Peaks festgestellt wurden
(FISCHER 1971).

Progesteronkonzentrationen im peripheren Plasma während verschiedener Trächtigkeitsstadien

Abb 9



5. DISKUSSION

Die Protein-Bindungsreaktion, wie sie von NEILL und Mitarb. (1967) zur Messung von Progesteron in Plasma von Frauen beschrieben und von HOFFMANN und KARG (1969/1970) für die Progesteronbestimmung im peripheren Plasma beim Rind adaptiert wurde, ist für den besprochenen Versuch verwendet worden. Dieses Verfahren besitzt, besonders nach Einführung des internen Standards zur Berechnung der Wiederfindung in den einzelnen Proben, eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität (siehe auch Kap. 3.3.7.1. und 3.3.7.3.).

Gegenüber anderen vergleichsweise empfindlichen und spezifischen Verfahren (gaschromatographisches Bestimmungsverfahren) zeichnet sich die hier verwendete Methode durch einen relativ geringen Arbeitsaufwand aus. So ist es möglich, pro Woche in 30 - 40 Plasma-proben Progesteron zu bestimmen.

Bei Anwendung dieser Methodik ist es jedoch unbedingt notwendig, auf eine möglichst sorgfältige Arbeitsweise zu achten, da die Protein-Bindungsreaktion durch Störfaktoren - meist unbekannter Art - relativ leicht beeinflussbar ist (MURPHY 1970). Zu Kontrollzwecken wurden daher in regelmäßigen Abständen Zusatzversuche mit kaltem Progesteron durchgeführt, ebenfalls wurde der Blindwert der Methode routinemäßig überprüft, wie dies bereits in den Kap. 3.3.7.2. und 3.3.7.1. dargelegt wurde.

Während der verschiedenen Phasen der Trächtigkeit standen uns 2 Kalbinnen und 6 Kühe zur Verfügung. Von jedem Tier wurden über einen längeren Zeitraum (50 bis 99 Tage) die Blutproben gewonnen, in denen dann

Progesteron bestimmt wurde. Durch diesen Versuchsansatz ist es möglich, individuelle Unterschiede in der Progesteronverlaufskurve, wie sie von POPE und Mitarb. (1969) und HOFFMANN und KARG (1970) bereits für den Zyklus nachgewiesen wurden, auch während der Gravidität zu erfassen. Um regulative Mechanismen zu erkennen, ist diese Art der kontinuierlichen Blutentnahme und des individuellen Bezugs absolut notwendig.

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden kann, steigt die Progesteronkonzentration am Anfang der Trächtigkeit mit der Entwicklung des Corpus luteum bis zum 20. bzw. bis zum 21. Tag an. In der kritischen Umstellungsphase vom Corpus luteum periodicum zum Corpus luteum graviditatis werden Progesteronkonzentrationen von 7,5 bis 12,4 ng/ml Plasma zwischen den Tagen 16 und 26 gemessen.

Aufgrund ihrer Vergleichsmessungen in Plasmaproben aus 5 Rinderzyklen und 5 Anfangsträchtigkeiten bis Tag 25 sehen HENRICKS et al. (1970) bereits ab Tag 10 bis Tag 14 in steiler ansteigenden und signifikant höheren Progesteronwerten die Anzeichen einer stattgehabten Befruchtung.

Demgegenüber glauben SHEMESH et al. (1968) das Vorliegen eines lebenden Embryo erst am Tag 19 feststellen zu können, wenn zu diesem Zeitpunkt ein Progesteronspiegel von über 3 ng/ml Plasma vorliegt. Diese Festsetzung auf Tag 19 scheint jedoch nicht immer anwendbar, da, wie HOFFMANN und KARG (1970) zeigen konnten, auch während eines normalen Zyklus der Progesteronspiegel im peripheren Blut u.U. erst nach dem 21. Tag abfallen kann.

Der Progesteronblutspiegel verläuft in der weiteren Phase der Trächtigkeit bis zu Tag 220 relativ konstant und bewegt sich in einer Höhe zwischen 4,2 und 9,3 ng.

Hierbei treten jedoch starke individuelle Unterschiede sowohl in der Verlaufskurve als auch in der absoluten Höhe des Progesteronspiegels auf, wie besonders aus Abb. 8 deutlich wird. Diese individuellen Unterschiede lassen statistische Berechnungen nur an einem sehr umfangreichen Tiermaterial sinnvoll erscheinen.

Während des letzten Trächtigkeitsdrittels fallen die Progesteronwerte bei der Kuh "P" bis zum 272. Tag von 9,3 auf 4,9 ng/ml Plasma kontinuierlich ab. Diese Beobachtung bestätigt die Befunde von POPE et al. (1969) und STABENFELDT et al. (1970). Hingegen treten bei der Kuh "At" starke Schwankungen zwischen den einzelnen Meßpunkten auf, die auf einen individuellen Ausschüttungsrhythmus zurückgeführt werden könnten, so daß dieser mögliche allmähliche Abstieg verdeckt ist.

Der bereits von STABENFELDT et al. (1970) und HOFFMANN und KARG (1970) gefundene drastische Progesteronabfall 1 - 2 Tage vor Geburt konnte auch hier festgestellt werden. In jedem Fall war zum Geburtszeitpunkt ein Minimalwert erreicht. Bei den beiden hier einander gegenüber gestellten Geburtskühen konnte, wie bereits von HOFFMANN und KARG (1970) berichtet, kein Unterschied zwischen einer glucocorticoidinduzierten Geburt bei der Kuh "P" und einer normalen Geburt bei der Kuh "At" festgestellt werden. Über die Anwendung von Glucocorticoiden zur Geburtsauslösung bei Rindern haben im einzelnen ADAMS (1969) und KARG und Mitarb. (1970) berichtet.

Demnach scheint bei der Spezies Rind die Geburtsauslösung mit einem kurz vorhergehenden Progesteronabfall gekoppelt zu sein. Welche Rolle die Glucocorticoide und die östrogenen Hormone - bekanntlich steigt beim Rind besonders die 17α -Östradiolproduktion während

des letzten Trächtigkeitsmonats stark an (ERB und Mitarb. 1968) - bei der unmittelbaren Geburtsauslösung spielen, konnte noch nicht geklärt werden.

Wie aus den parallel durchgeführten Versuchen von FISCHER (1971) hervorgeht, traten während der Gravidität bei den Kühen "Ap" und "Zt" an den Tagen 206 bzw. 94 und 103 kurzzeitige LH-Anstiege auf. Aus den vorliegenden Progesteronbestimmungen geht hervor, daß diese LH-Anstiege weder durch ein vorhergehendes Absinken des Progesteronspiegels provoziert wurden, noch in einem anschließenden signifikanten Progesteronanstieg resultierten. Auch im Verlauf des Puerperiums - Blutproben wurden bis 30. bzw. 39. Tag post partum gewonnen und analysiert - bewirkte eine Erhöhung des LH-Spiegels (FISCHER 1971) keine positive Veränderung des konstant niedrigen Progesteronspiegels von 0,5 bis 1,7 ng/ml Plasma. Das zyklische Geschehen mit Ovulation und anschließender Gelbkörperbildung ist somit noch nicht in Gang gekommen.

Nach unseren Befunden während der Gravidität kann aus den "in vitro"-Befunden von MILLS und MORRISSETTE (1970), die in Versuchen mit Gelbkörper-Perfusionen aus verschiedenen Trächtigkeitsstadien vom Rind bei LH-Zugabe eine erhöhte Progesteronproduktion nachweisen konnten, nicht unbedingt auf die "in vivo"-Verhältnisse geschlossen werden.

Auch zu den Befunden von KARG und Mitarb. (1969/1970), die bei einigen Kühen zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus, z.B. Tag 9 und 16, eine Erhöhung des endogenen LH-Spiegels im Zusammenhang mit nachfolgendem Progesteronanstieg nachweisen konnten, gab es in den vorliegenden die Gravidität betreffenden Untersuchungen keine Parallele.

Aus diesen Befunden könnte geschlossen werden, daß die luteotrope Wirkung von LH beim Rind nur dann zutage tritt, wenn eine bestimmte Ausgangssituation vorliegt. Diese scheint dann gegeben zu sein, wenn bei nur geringer Syntheseleistung des Corpus luteum-Gewebes dieses durch ein aktives luteolytisches Prinzip noch nicht inaktiviert zu werden beginnt.

Möglicherweise steht nach KARG und Mitarb. (1970) die LH-Ausschüttung während der Gravidität im Zusammenhang mit einer Östrogenwirkung.

Es gilt also weitere Faktoren zu klären, da eine ausschließliche LH-Progesteron-Beziehung nicht zu bestehen scheint.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit einer spezifischen und empfindlichen Protein-Bindungsmethode wurde Progesteron im peripheren Blut von 6 Kühen und 2 Kalbinnen, die sich in verschiedenen Trächtigkeitsstadien befanden, bestimmt. Jeweils 4 Tiere repräsentierten eine komplette Trächtigkeitsperiode. Die Progesteronanalysen wurden in Proben, die im Abstand von 4 bzw. 5 Tagen gewonnen wurden, vorgenommen.
2. Nach einem anfänglichen Anstieg des Progesteronspiegels mit der Entwicklung des Corpus luteum ist der Übergang des Corpus luteum periodicum zum Corpus luteum graviditatis durch hohe Progesteronwerte von 7,5 bis 12,4 ng/ml Plasma zwischen den Trächtigkeitstagen 16 und 26 gekennzeichnet. Der Progesteronspiegel verläuft dann ziemlich konstant, um erst ab Tag 260 eine absteigende Tendenz zu zeigen. Zu allen Zeitpunkten der Trächtigkeit konnten individuelle Unterschiede in der Progesteronverlaufskurve und in der absoluten Höhe des Progesteronblutspiegels beobachtet werden. Einen Tag vor der Geburt fällt er abrupt auf Werte um 1 ng/ml Plasma ab. Die Progesteronwerte im Puerperium, soweit gemessen (30. bzw. 39. Tag post partum) lagen zwischen 0,5 und 1,7 ng/ml Plasma.
3. In Trächtigkeitsstadien mit einem kurzzeitigen LH-Anstieg (Kuh "Ap" 206. Trächtigkeitstag, Kuh "Zt" 94. und 103. Trächtigkeitstag) wurde Progesteron einmal bzw. zweimal täglich bestimmt. Dramatische Änderungen im Progesteronblutspiegel wurden weder vor noch nach einem solchen LH-Gipfelwert (Peak) beobachtet. Direkte Beziehungen zwischen LH- und Progesteron konnten somit während der Gravidität nicht aufgezeigt werden. Weitere beeinflussende Faktoren sind deshalb in Betracht zu ziehen.

S U M M A R Y

1. Using a specific and sensitive competitive protein binding assay progesterone was determined in peripheral plasma of two pregnant heifers and six pregnant cows representing two complete pregnancy periods. Progesterone was determined in 4 day and 5 day intervals respectively.
2. After an initial rise of peripheral progesterone levels with the development of the corpus luteum the change of the corpus luteum periodicum to the corpus luteum graviditatis is marked by levels between 7,5 and 12,4 ng/ml plasma during days 16 - 26. The progesterone concentration remained then fairly constant and began to show a decreasing tendency past day 260. A sharp drop to levels around 1 ng/ml plasma is observed one day before delivery. Progesterone values during puerperium (until day 30 and 39 post partum resp.) vary between 0,5 and 1,7 ng/ml plasma. During all phases examined individual variations in the secretion pattern as well as in the absolute values of progesterone were obvious.
3. In certain phases of gestation (cow "Ap" day 206 of gestation, cow "Zt" day 94 and 103), where a short lasting LH-release was observed, progesterone was determined 1 or 2 times per day. No dramatic changes in progesterone secretion were measured before and after these LH-peaks had occurred. Thus there seems to be no direct relation between progesterone and LH during gestation.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Adams W.M.

The elective induction of labor and parturition
in cattle.

J.A.M.V.M.A. 154, 261 (1969)

Amoroso E.C.

Ovarian activity in the pregnant mare.

Nature 161, 355 (1948)

Anderson L.L., Melampy R.M.

Hypophysial and uterine influences on pig luteal
function.

Reproduction in the Female Mammal, ed. G.E.Lamming
and E.C. Amoroso, Butterworth & Co. Ltd. London,
University of Nottingham 1966 , S.225

Armstrong D.T., Hansel W.

Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin.

J.Dairy Sci. 42, 533 (1959)

Asdell S.A.

Patterns of mammalian reproduction.

2 nd ed. Comstock Publ. Ass. Ithaka
Cornell University Press 1964

Astwood E.B.

The regulation of corpus luteum function by
hypophysial luteotropin.

Endocrinology 28, 309 (1941)

Balfour W.E., Comline R.S., Short R.V.

Secretion of progesterone by the adrenal gland.

Nature, London 180, 1480 (1957)

Bassett J.M., Thorburn G.D.

Foetal plasma corticosteroids and the initiation of parturition in sheep.

J. Endocr. 44, 285 (1969)

Bassett J.M., Oxborrow T.J., Smith I.D., Thorburn G.D.

The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe.

J. Endocr. 45, 449 (1969)

Bertrand M., Deschanel J.P.

Les gonadotropines chez la vache.

Ber. d. 5. Int. Kongr. f. tier. Fortpfl. und künstl. Besamung

Trient, 5, 283 (1964)

Butenandt A., Westphal U., Cobler H.

Über einen Abbau des Stigmasterins zu Corpus luteum-wirksamen Stoffen; ein Beitrag zur Konstitution des Corpus-luteum-Hormons.

Ber. deut. chem. Ges. 67, 1611 (1934)

Bowerman A.M., Melampy R.M.

Progesterone and Δ^4 Pregnen-20 β -ol-3-one in bovine reproductive organs and body fluids.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 45 (1962)

Caldwell B.V.

The role of the uterus in the regulation of ovarian periodicity.

21. Mosbacher Kolloquium d. Ges. f. Biol. Chemie

Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg

1970 im Druck

Catchpole H.R.

Hormonal mechanisms during pregnancy and parturition.

In: "Reproduction in Domestic Animals"

(ed. H.H. Cole and P.T. Cupps)

Academic Press, Inc. New York, p.415 1969

Clegg M.T., Boda T.M., Cole H.H.

The endometrial cups and allantochorionic pouches
in the mare with emphasis on the source of equine
gonadotrophin.

Endocrinology 54, 448 (1954)

Cole H.H., Goss H.

The source of equine gonadotrophin.

In: "Essay in biology", 107, Univ. Calif. Berkeley
Calif. 1943

Cole H.H., Saunders F.J.

Concentration of gonad stimulating in blood serum
and of oestron in urine throughout pregnancy in
the mare.

Endocrinology 19, 199 (1935)

Cowie A.T., Daniel P.M., Prichard M.L., Tindal J.S.

Hypophysectomy in pregnant goats, and section
of the pituitary stalk in pregnant goats and sheep.
J. Endocr. 28, 93 (1963)

Cutuly E.

Effects of lactogenic and gonadotrophic hormones
on hypophysectomized pregnant rats.

Endocrinology 31, 13 (1942)

Davis M.E., Plotz E.J.

The metabolism of progesterone and its clinical
use in pregnancy.

Recent Progr. Hormone Res. 13, 347 (1957)

Day B.N., Anderson L.L., Emmerson M.A., Hazel L.N.,
Melampy R.M.

Effect of estrogen and progesterone on early
embryonic mortality in ovariectomized gilts.

J. Anim. Sci. 18, 607 (1959)

Deane H.W., Hay M.R., Moor R.M., Rowson L.E.A., Short R.V.
Histochemical and electron microscopic features of
ovine corpora lutea in relation to progesterone
content.

2 nd Int. Congr. Hormonal Steroids Milan, Excerpta
Medica Foundation, Int. Congr. Ser. 111, 257 (1966)

Denamur R., Martinet J.

Effects de l' ovariectomie chez la brebis pendant
la gestation.

C.R. Soc. Biol. (Paris) 149, 2105 (1955)

Denamur R., Mauleon P.

Controle endocrinien de la persistance du corps
jaune chez les ovins.

Compt. Rend. 257, 527 (1963)

Diczfalusy E.

Progesterone in human placental tissue.

Acta Endocr., Copenh. 10, 373 (1952)

Donaldson L.E., Hansel W.

Prolongation of life span of the bovine corpus
luteum by single injections of bovine luteinizing
hormone.

J.Dairy Sci. 48, 903 (1965)

Du Mesnil Du Buisson F., Dauzier L.

Influence de l'ovariectomie chez la truie pendant
la gestation.

C.R. Soc. Biol. (Paris) 161, 311 (1957)

Du Mesnil Du Buisson F., Leglise P.C.

Effet de l' hypophysectomie sur les corps jaunes
de la truie. Resultats preliminaires.

Compt. Rend. 257, 261 (1963)

Edgar D.G., Ronaldson J.W.

Blood levels of progesterone in the ewe.

J. Endocr. 16, 378 (1958)

Eik-Nes K., Schellman J.A., Lumry R., Samuels L.T.

The binding of steroids to protein.

I. Solubility determinations

J. biol. Chem. 206, 411 (1954)

Eik-Nes K.B., Hall P.F.

Isolation of dehydroepiandrosterone - C¹⁴ from dogs infused with Cholesterol-4-C¹⁴ by the spermatic artery.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111, 280 (1962)

Erb R.E., Estergreen V.L.Jr., Gomes W.R., Plotka E.D., Frost O.L.

Progesterone levels in corpora lutea and progesterone in ovarian venous and jugular vein blood plasma of the pregnant bovine.

J.Dairy Sci. 51, 401 (1968)

Erb R.E., Nofziger J.C., Stormshak F., Johnson J.B.

Progesterone in corpora lutea, ovaries and adrenals of pregnant sows and its relationship to number of implants.

J. Anim. Sci. 21, 562 (1962)

Erb R.E., Randel R.D., Mellin T.N., Estergreen V.L.Jr.

Urinary estrogen excretion rates during pregnancy in the bovine.

J.Dairy Sci. 51, 416 (1968)

Estergreen V.L.Jr., Frost O.L., Gomes W.R., Erb R.E., Bullard J.F.

Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows.

J.Dairy Sci. 50, 1293 (1967)

Fischer S.

Bestimmung von Luteinisierungshormon im peripheren Rinderblut während verschiedener Phasen der Trächtigkeit.

Vet.med. Diss. 1971 in Vorbereitung

Fraenkel L., Cohn F.

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Corpus luteum auf die Insertion des Eies.
Anat. Anz. 20, 294 (1902)

Gomes W.R., Erb R.E.

Progesterone in bovine reproduction: A Review.
J.Dairy Sci. 48, 314 (1965)

Gomes W.R., Frost O.L., Estergreen V.L.Jr.

Progestins in ovarian and peripheral blood of cows during late pregnancy.
J.Dairy Sci. 45, 670 (1962)

Gorski J., Erb R.E., Dickson W.M., Butler H.C.

Sources of progestins in the pregnant cow.
J.Dairy Sci. 41, 1380 (1958)

Grant J.K.

The gas liquid chromatography of steroids.
In: "Memoirs of the society for endocrinology"
Cambridge University Press 16, 155 (1967)

Hagerman D.D., Williams K.L.

Comparison of a protein binding displacement method with a double isotope derivative method for determination of plasma progesteron.
Amer. J. Obstet. Gynec. 104, 114 (1969)

Hansel W.

Studies on the formation and maintenance of the corpus luteum.

In: "Reproduction in the Female Mammal"

ed G.E. Lamming and E.C. Amoroso Butterworth & Co.

Ltd. London, University of Nottingham 1966 , S. 3+6

Hansel W., Snook R.B.

Pituitary ovarian relationships in the cow.

J.Dairy Sci. 53, 945 (1970)

Haraszti J., Feher T., Baksai E.H.

Excretion of pregnanediol by cows during cycle.

Acta Veterinaria Academiae Scientiarum

Hungaricae Tomus 18, 373 (1968)

Hayano M., Saba N., Dorfman R.I., Hechter O.

Some aspects of the biogenesis of adrenal steroid hormones.

Recent Progr. Hormone Res. 12, 79 (1956)

Heap R.B., Linzell J.L.

Plasma progesterone levels in the goat and mammary uptake during pregnancy.

J. Physiol. (Lond) 180, 10 (1965)

Heap R.B., Linzell J.L.

Arterial concentration, ovarian secretion and mammary uptake of progesterone in goats during the reproductive cycle.

J. Endocr. 36, 389 (1966)

Henricks D.M., Dickey J.F., Niswender G.D.

Serum luteinizing hormones and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows.

Biol. Reprod. 2, 346 (1970)

Henricks D.M., Oxenreider S.L., Anderson L.L.

Ovarian function after hypophysial stalk transection in the cow.

Amer. J. Physiol. 216, 1213 (1969)

Hoffmann B.

Gaschromatographische Bestimmung von Progesteron im Gewebe von Corpus luteum-Zysten bei Kühen.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 76, 287 (1969)

Hoffmann B., Karg H.

Determination of progesterone in bovine peripheral plasma by competitive protein binding.

Ann. Endocr. 31, 823 (1970)

Hoffmann B., Karg H.

Determination of progesterone in bovine peripheral plasma under different physiological conditions using the competitive protein binding method.

3rd Int. Congr. on Hormonal Steroids, Hamburg
Excerpta Medica Foundation, ICS 210, 104 (1970)

Hutchinson D.L., Westover J.L., Will D.W.

The destruction of the maternal and fetal pituitary glands in subhuman primates.

Amer. J. Obstet. Gynec. 83, 857 (1962)

Jöchle W.

Exogene und endogene Einflüsse auf Tragezeitdauer und Geschlechtsverteilung der Nachkommen beim Pferd.

Zuchthyg. Fortpflanz.-Stör. Besam. Haustiere 1, 238
(1957)

Jöchle W.

Physiologische Rolle des Progesterons.

In: "Handbook of experimental pharmacology"

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 22, 626
(1969)

Johnson G.E., Challans J.S.

Ovariectomy and corpus luteum extract experiments
in pregnant rats.

Anat. Rec. 47, 300 (1930)

Johnson K.R., Erb R.E.

Maintenance of pregnancy in ovariectomized cattle
with progestin compounds and their effect on
progestin levels in the corpus luteum.

J.Dairy Sci. 45, 633 (1962)

Kaltenbach C.C., Graber J.W., Niswender G.D., Nalbandov A.V.

Luteotrophic properties of some pituitary hormones
in nonpregnant or pregnant hypophysectomized ewes.

Endocrinology 82, 818 (1968)

Karg H.

Endokrine Regelkreise der Fortpflanzung und deren
willkürliche Steuerung.

Z. Tierzücht. u. Züchtungsbiol. 84, 262 (1968)

Karg H., Hoffmann B., Schams D.

Verlauf der Blutspiegel an Progesteron, Luteinisierungs-
hormon und Prolaktin während des Zyklus bei einer Kuh.

Zuchthyg. 4, 149 (1969)

Karg H., Hoffmann B., Schams D.

LH -, prolactin- and progesterone-relationship in
vivo (data from the bovine)

3 rd Int. Congr. on Hormonal Steroids, Hamburg
1970 in press

Karg H., Schams D., Hoffmann B., Böhm S.

Blood level of prolactin, LH and progesterone in
cows before, during and after normal resp. the
corticoidinduced parturition.

Symp. Dtsch. Ges. Endocr. 16, Referat Nr. 65

1970 in press

Karlson P.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 4. Aufl. 1964

Klopper A.

The excretion of pregnandiol during the normal menstrual cycle.

(J.Endocr. 13, 291 (1956)

In: Dorfman R.I. "Methods in Hormone Research 1, 145
(1962)

Kolb E.

Lehrbuch der Physiologie der Haustiere

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 2. Aufl. 1967

Leclercq M., Derivaux J.

Considerations sur certaines proprietes de la gonadotropine du serum de jument gravide.

Bull. Acad. vet., France 38, 357 (1965)

Lindner H.R., Sass M.B., Morris B.

Steroids in the ovarian lymph and blood of conscious ewes.

J. Endocr. 30, 361 (1964)

Linzell J.L., Heap R.B.

A comparison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat; Sources of production and an estimation of uptake by some target organs.

J. Endocr. 41, 433 (1968)

Marker R.E., Rohrmann E.

Pregnenediol in mares' pregnancy urine and its conversion into progesterone.

J. Amer. chem. Soc. 60, 1565 (1938)

Marshall J.R., Hammond C.B., Ross G.T., Jacobson A.,
Rayford P., Odell W.D.

Plasma and urinary chorionic gonadotrophin
during early human pregnancy.

Obstet. and Gynec. 32, 760 (1968)

Masuda H., Anderson L.L., Henricks D.M., Melampy R.M.

Progesterone in ovarian venous plasma and
corpora lutea of the pig.

Endocrinology 80, 240 (1967)

Mc Donald L.E., Mc Nutt S.H., Nichols R.E.

On the essentiality of the bovine corpus luteum
of pregnancy.

Amer. J. vet. Res. 14, 539 (1953)

Mc Donald L.E., Nichols R.E., Mc Nutt S.H.

Studies on corpus luteum ablation and progesterone
replacement therapy during pregnancy in the cow.

Amer. J. vet. Res. 13, 446 (1952)

Meites J., Webster H.D., Young F.W., Thorpe F.J., Hatch R.N.

Effect of corpora lutea ablation and replacement
therapy with progesterone on gestation in goats.

J. Anim. Sci. 10, 411 (1951)

Melampy R.M., Hearn W.R., Rakes J.M.

Progesterone content of bovine reproductive organs
and blood during pregnancy.

J. Anim. Sci. 18, 307 (1959)

Miller W.R., Turner C.W.

Biosynthesis of steroids from Pregnenolone -16-³H
by bovine ovarian tissue in vitro.

Steroids 2, 657 (1963)

Mills R.C., Morrisette M.C.

Progesterone synthesis by perfused bovine ovaries of early and late pregnancy.

J. Reprod. Fert. 22, 435 (1970)

Moore N.W., Rowson L.E.A.

Maintenance of pregnancy in ovariectomized ewes by means of progesterone.

Nature, (Lond.) 184, 1410 (1959)

Murphy B.E.P.

Methodical problems in competitive protein binding techniques; the use of sephadex column chromatography to separate steroids.

2 nd Symp. on Steroid Assay by Protein Binding
Genf 1970

Murphy B.E.P.

Some studies on the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay.

J. clin. Endocr. 27, 973 (1967)

Murphy B.E.P., Engelberg W., Patty C.J.

Simple method for the determination of plasma corticoids.

J. clin. Endocr. 23, 293 (1963)

Nalbandov A.V.

First Annual Carl G. Hartman Lecture.

Comparative aspects of corpus luteum function.

Biol. Reprod. 2, 7 (1970)

Neher G.M., Zarrow M.X.

Concentration of progestin in the serum of the non-pregnant, pregnant and post partum ewe.

J. Endocr. 11, 323 (1954)

Neill J.D., Johansson E.D.B., Datta J.K., Knobil E.

Relationship between the plasma levels of luteinizing hormone and progesterone during the normal menstrual cycle.

J. clin. Endocr. 27, 1167 (1967)

Nishikawa Y., Hafez E.S.E.

Reproduction of horses

In: "Reproduction in Farm Animals" ed. E.S.E. Hafez, Washington State University,

Lea & Febiger, Philadelphia p. 289 1968

Pearlman W.H.

Discussion of paper by R.V. Short.

Ciba Found. Coll. Endocr. 11, 377 (1957)

Pearlman W.H., Cerceo E.

The isolation of progesterone from human placenta.

J. biol. Chem. 198, 79 (1952)

Plotka E.D., Erb R.E., Callahan C.J., Gomes W.R.

Levels of progesterone in peripheral blood plasma during the estrous cycle of the bovine.

J.Dairy Sci. 50, 1158 (1967)

Pope G.S., Gupta S.K., Munro I.B.

Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows.

J. Reprod. Fert. 20, 369 (1969)

Reeves B.D., De Souza M.L.A., Thompson I.E., Diczfalusy E.
An improved method for the assay of progesterone
by competitive protein binding.

Acta Endocr. 63, 225 (1970)

Schams D.

Radioimmunologische Bestimmung des Luteinisierungshormons (LH) im Blutserum von Kühen in den ersten zwei Monaten der Trächtigkeit.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 76, 561 (1969)

Schomberg D.W., Coudert S.P., Short R.V.

Effects of bovine luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin on the bovine corpus luteum in vivo.

J. Reprod. Fert. 14, 277 (1967)

Shemesh M., Ayalon N., Lindner H.R.

Early effect of conceptus on plasma progesterone level in the cow.

J. Reprod. Fert. 15, 161 (1968)

Shimizu K., Dorfmann R.I., Gut M.

Isocaproic acid, a metabolite of 20α -hydroxy-cholesterol.

J. biol. Chem. 235, PC 25 (1960)

Short R.V.

Progesterone in placentae of domestic animals.
Nature, (Lond.) 178, 743 (1956)

Short R.V.

Progesterone and related steroids in the blood of domestic animals.

Ciba Found. Coll. Endocr. 11, 362 (1957)

Short R.V.

Progesterone in blood. IV. Progesterone in the blood of mares.

J. Endocr. 19, 207 (1959)

Short R.V.

Blood progesterone levels in relation to parturition.

J. Reprod. Fert. 1, 61 (1960)

Short R.V., Moore N.W.

Progesterone in blood. V. Progesterone and 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one in the placenta and blood of ewes.

J. Endocr. 19, 288 (1959)

Smith V.R., Mc Shan W.H., Casida L.E.

On maintenance of the corpora lutea of the bovine with lactogen.

J. Dairy Sci. 40, 443 (1957)

Snook R.B., Brunner M.A., Saatman R.R., Hansel W.

The effect of antisera to bovine LH in hysterectomized and intact heifers.

Biol. Reprod. 1, 49 (1969)

Spies H.G., Gier H.T., Wheat J.D.

Maintenance of early pregnancy in ovariectomized gilts treated with gonadal hormones.

J. Anim. Sci. 19, 144 (1960)

Stabenfeldt G.H., Ewing L.L., Mc Donald L.E.

Peripheral plasma progesterone levels during the bovine estrous cycle.

J. Reprod. Fert. 19, 433 (1969)

Stabenfeldt G.H., Osburn B.I., Ewing L.L.

Peripheral plasma progesterone levels in the cow during pregnancy and parturition.

Amer. J. Physiol. 218, 571 (1970)

Stormshak F., Erb R.E.

Progestins in bovine corpora lutea, ovaries, and adrenals during pregnancy.

J.Dairy Sci. 44, 310 (1961)

Tanabe T.Y., Hokanson J.F., Griel L.C.

Minimal exogenous progesterone requirements for maintenance of pregnancy in dairy cows after corpus luteum removal via laparotomy.

2 nd World Conference on Animal Reproduction
University of Maryland Press, p.370 1968

Tillson S.A., Erb R.E.

Progesterone concentration in peripheral blood plasma of the domestic sow prior to and during early pregnancy.

J. Anim. Sci. 26, 1366 (1967)

Turner C.D.

General Endocrinology

W.B. Saunders Company, Philadelphia, London,
4 th edition 1966

Venning E.

The secretion of various hormones and the activity of the adrenal cortex in pregnancy.

In: "Gestation", New York J.M.Jr. Foundation 1957

Weliky I., Engel L.L.

17-Hydroxypregnenolone as a precursor for cortisol.

Fed. Proc. 20, 179 (1962)

Wiltbank J.N., Rothlisberger J.A., Zimmerman D.R.

Effect of human chorionic gonadotrophin on
maintenance of the corpus luteum and embryonic
survival in the cow.

J. Anim. Sci. 20, 827 (1961)

Woolever C.A., Goldfien A.

A double-isotope derivative method for plasma
progesterone assay.

Int. J. Appl. Radiation and Isotopes 14, 163 (1963)

Zander J., von Münstermann A.M.

Progesteron im menschlichen Blut und Geweben.

Klin. Wschr. 34, 494 (1956)

Zimbelman R.G., Loy R.G., Casida L.E.

Biochemical studies of the bovine corpus luteum
of early pregnancy.

J. Anim. Sci. 18, 1551 (1959)

Zimbelman R.G., Loy R.G., Casida L.E.

Variation in some biochemical and histological
characteristics of bovine corpora lutea during
early pregnancy.

J. Anim. Sci. 20, 99 (1961)

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg gilt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Ebenso danke ich Herrn Dr. B. Hoffmann für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

L E B E N S L A U F

Am 4. April 1942 wurde ich, Erich Josef März, als Sohn der Landwirtseheleute Franz und Regina März in Türkheim/Bayern geboren.

Nach fünf Jahren Volksschule in Siebnach, Kreis Mindelheim, besuchte ich das Humanistische Gymnasium Neuburg/Donau, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend leistete ich einen 24-monatigen Wehrdienst und begann im Wintersemester 1964/65 in München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich im Sommersemester 1969 mit der tierärztlichen Prüfung beendete.

Bis zum Beginn der Dissertation im Januar 1970 arbeitete ich an der Tierklinik Strömsholm/Schweden und in einer tierärztlichen Praxis im Kanton Bern/Schweiz.

Die Arbeiten zu vorliegender Dissertation wurden zwischen Januar und Oktober 1970, während der ich eine wissenschaftliche Hilfskraftstelle am Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weißenstephan innehatte, durchgeführt.

